

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DESARROLLO DE NANOSISTEMAS POLIMÉRICOS INCORPORANDO
ACTIVOS NATURALES Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN*
*VITRO***

Por

ARELY MATAMOROS ACOSTA

**Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

Enero del 2020

**DESARROLLO DE NANOSISTEMAS POLIMÉRICOS INCORPORANDO
ACTIVOS NATURALES Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN*
*VITRO***

Comité de tesis

Dra. Azucena del Carmen González Horta

Presidente

Dra. Aida Rodríguez García

Secretario

Dr. José Ezequiel Viveros Valdez

Vocal 1

Dr. Abelardo Chávez Montes

Vocal 2

Dra. Brenda González Hernández

Vocal 3

**DESARROLLO DE NANOSISTEMAS POLIMÉRICOS INCORPORANDO
ACTIVOS NATURALES Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN*
*VITRO***

Dirección de tesis

Dra. Azucena del Carmen González Horta

Director

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a la Doctora Azucena por todo el apoyo que me brindo durante todo este tiempo que me permitió formar parte de su equipo de trabajo, por toda su paciencia y dedicación hacia conmigo y el proyecto, por sus consejos y correcciones, gracias por todos los momentos vividos durante este tiempo, siempre voy a estar muy agradecida con usted por hacerme crecer como persona, por la formación que me llevo, por todas sus enseñanzas, gracias por siempre transmitir sus conocimientos y compartir tips para mejorar, agradezco también al Doctor Abelardo, por tantos años de su tiempo invertidos en hacerme ganar conocimientos y experiencias, por siempre estar al pendiente de mi avance y formar parte de él, por compartir su conocimiento conmigo y apoyarme en la realización de este proyecto con mucha paciencia y asertividad, gracias a ambos por estos casi 6 años de ayudarme a adquirir conocimientos infinitos son muy importantes para mi y de verdad no hay manera de agradecerles todo ese tiempo invertido. Gracias a los doctores miembros de mi comité al Doctor Ezequiel que siempre me ha apoyado y ha sido muy amable y accesible, siempre se ha interesado por mi avance, a la Doctora Brenda que también hace ya bastante tiempo de convivir con ella mil gracias por siempre tener esa actitud optimista, por apoyarme siempre que lo necesite y ser una persona empática, a la Doctora Aida porque siempre se interesó por el proyecto y aportaba consejos importantes, siempre estuvo dispuesta a apoyarme, gracias a todos por lo que cada uno sembró en mi y por el tiempo que dedicaron en ayudarme a ser una mejor persona.

Gracias a mi alma mater Facultad de Ciencias biológicas de la UANL por el apoyo que me brindo para el desarrollo de la investigación, a todos mis profesores miembros del programa de estudios que curse y Finalmente, a CONACYT por los fondos aportados para la realización del proyecto

DEDICATORIAS

Nada te turbe, nada te espante, todo se pasa, Dios no se muda, la paciencia todo lo alcanza; Quien a Dios tiene nada le falta: solo Dios basta.

Dedico y agradezco con todo mi ser a Dios por permitirme culminar otra etapa más en mi vida y darme las fuerzas necesarias para llegar hasta el final, gracias, señor por todas las bendiciones que me das, por las personas que están en mi vida por que gracias a ellos el camino de estos 4 años fue mas sencillo, menos agobiante y más feliz.

Gracias a mis preciosa familia mi papá, mi mamá y Dany sin ustedes jamás hubiese llegado hasta aquí ,gracias por apoyarme incondicionalmente en todo este tiempo, por escucharme por alentarme por estar siempre para mí, gracias por darme tanto amor y hacerme sentir tan feliz y segura, por siempre creer en mí y en la capacidad de la que hasta yo dudaba en ocasiones, son mi motor y no saben cuanto agradezco tenerlos conmigo, gracias por siempre tenerme paciencia y comprensión y por que siempre tienen las palabras adecuadas para la situación que sea. los amo, dedico esta tesis a ustedes como una muestra de mi amor y agradecimiento por todo lo que hacen por mí y por que hoy veo llegar a su fin una de las metas de mi vida. gracias por darme el tesoro mas valioso que puede dársele a un hijo: el amor pues sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. A mis abuelos, a los que me ven desde el cielo y llevo en mi corazón y a los que puedo ver en la tierra, gracias por preocuparse siempre por mi trayecto en el estudio, por siempre desear lo mejor para mí.

Gracias a Exiquio mi amor, no imaginas lo feliz que me siento de haber coincidido contigo en este proyecto que comenzó como compañeros del mismo camino escolar y que Dios nos permitió continuar como compañeros de vida hasta el día de hoy, gracias por todo tu amor, por que siempre estas para apoyarme eres una pieza clave en mí, agradezco infinitamente tu existencia y tu presencia en mi vida la hace más feliz, más luminosa, mejor en todos los aspectos.

A lupita amiga mil gracias por todo lo vivido y compartido durante estos años has sido una amiga en toda la extensión de la palabra he llorado contigo, compartido frustración, momentos alegres, de preocupación, de cultura, de aprendizaje muchas gracias por estar siempre ahí, voy a extrañar mucho trabajar juntas, las risas, los apuros, los chistes locales, las aventuras, los viajes a congresos, siempre haz estado en todo el desarrollo de mi etapa como investigadora te quiero mucho.

A mis niñas Nelly y Cecy pequeñas gracias infinitas por su apoyo, por que a pesar de que cada una tomo un camino distinto al salir de licenciatura la amistad que construimos ha sido muy fuerte y ustedes han estado ahí todo el tiempo cuidándome del estrés y buscando maneras de hacer que un día malo se convirtiera en uno mejor. Gracias por su amistad las amo.

Gracias a mi tiuchis y fam Perez Acosta, verdaderamente siempre se interesan por mi felicidad y por brindarme palabras de aliento los quiero mucho

Gracias a todos mis compañeros de clases y de laboratorio por que cada uno de ustedes dejo una enseñanza en mí.

Gracias Mayte por tu amistad que, a pesar del tiempo y la distancia, no se acaba, el doctorado me dio la oportunidad de podernos ver de nuevo en la parte que menos imaginamos, gracias por recibirme en tu casa y mantenerte siempre al tanto de todo.

Gracias a todas las personas que, aunque no mencione de una forma u otra contribuyeron en mi formación y éxito.

ÍNDICE

Lista de figuras y tablas	i
Abreviaturas	ii
1 INTRODUCCION	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 Nanopartículas y sus características fisicoquímicas	2
2.1.2 Las nanopartículas como sistema de liberación	4
2.1.3 Nanopartículas de ácido polilactico- co -glicólico (PLGA)	6
2.1.4 Aplicaciones de las nanopartículas	8
2.2 Uso de venenos animales en la medicina	11
2.2.1 El veneno de abeja	12
2.2.2 Características de la melitina	12
2.2.3 Propiedades anticancerígenas de la melitina	14
2.3 Uso de fitoquímicos de alimentos en la medicina	16
2.3.1 Avenantramidas metabolitos secundarios de la avena	19
2.3.2 Avenantramida C	23
2.4 Actividad anticancerígena de la melitina y Avenantramida -C	26
3 JUSTIFICACIÓN	29
4 HIPOTESIS	30
5 OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo General	31
5.2 Objetivos Específicos	31
6 MATERIALES Y METODOS	32
6.1 Materiales	32
6.2 Preparación deL agregado de melitina	32
6.3. Caracterización de las formulaciones de nanopartículas de melitina y Avenantramida C	32
6.3.1 Preparación de nanopartículas de melitina	33
6.3.2 Dicroísmo Circular	33
6.3.3 Cuantificación de la melitina presente en la superficie de las nanopartículas	34
6.4 Nanopartículas de Avenantramida C	34
6.4.1 Preparación de Avenantramida C	34
6.4.2 Preparación de nanopartículas de Avenantramida	35
6.4.3 Cuantificación de la Avenantramida C presente en las nanopartículas	35
6.5 Microscopía de transmisión electrónica	35
6.6 Cinética de liberación de la Avenantramida C	35
6.7 Preparación de suspensiones multilaminares	36
6.7.1 Preparación de vesículas unilamelares grandes	36
6.8 Cuantificación de fosfolípidos	36
6.9 Ensayos de liberación de contenidos acuosos	37
6.10. Ensayos in vitro de las nanopartículas con Avn -C en la línea celular MCF7	38
7 RESULTADOS	39
8 DISCUSION	51
9 CONCLUSIONES	57
10 PERESPECTIVAS	58
11 REFERENCIAS	59

Índice de figuras y tablas

Tabla 1. Características de los diferentes tipos de nanoportadores utilizados como sistemas de liberación	5
Tabla 2. Métodos de preparación de nanopartículas de Ácido polilactico-co- glicólico (PLGA).....	7
Tabla 3. Ventajas de la encapsulacion de ingredientes activos.....	11
Tabla 4. Efectos benéficos atribuidos a los compuestos polifenólicos.....	19
Tabla 5. Modificaciones realizadas en el péptido melitina	27
Figura 1. Diferentes tipos de nanopartículas.....	4
Figura 2. Hidrólisis de nanopartículas de PLGA	7
Figura 3. Tipo de nanopartículas de PLGA: nanocápsulas y nanoesferas	8
Figura 4. Estructura de la melitina.....	13
Figura 5. Estructura química básica de las principales clases de polifenoles.....	17
Figura 6. Estructura química y nombre de algunas Avenantramidas naturales	20
Figura 7. Breve descripcion del papel de Avns en la inivicion de la actividad de la quinasa IKK β	21
Figura 8. Funciones de las avenantramidas que generan beneficios para la salud.....	24
Figura 9. Estructura química de la Avenantramida	28
Figura 10. Beneficios de la Avenantramida C.....	26
Figura 11. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano para la melitina monomérica.....	39
Figura 12. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano de la suspensión de nanopartículas de PLGA.....	40
Figura 13. Espectros de emisión de fluorescencia de las nanopartículas de PLGA cargadas con melitina.....	41
Figura 14. Tamaño promedio de las nanopartículas de PLGA con melitina.....	42
Figura 15. Curva de calibración de melitina.....	43
Figura 16. Cromatografía de exclusión molecular de la purificación de liposomas.....	44
Figura 17. Abundancia relativa de fosfolípidos en células epiteliales mamarias humanas y líneas celulares de cáncer de mama.....	45
Figura 18. Cinéticas de liberación de contenidos acuosos desde liposomas de diferente composición.....	46
Figura 19. Efecto de la relación péptido/lípido en la liberación de contenidos acuosos.....	47
Figura 20. Tamaño promedio de las nanopartículas de PLGA encapsulando Avenantramida C.....	48
Figura 21. Imagen SEM de nanopartículas PLGA-Avenantramida C.....	49
Figura 22. Curva de calibración de Avevantramida -C.....	50
Figura 23. Perfil de liberación in vitro de nanopartículas de PLGA.....	51

ABREVIATURAS

Avns	Avenantramidas
Avn C	Avenantramida C
SOD	superóxido dismutasa
ON	Óxido Nítrico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Nm	Nanómetros
PLA ₂	fosfolipasa A ₂
PLA	ácido poliláctico glicólico
SEM	Microscopia electrónica de barrido
PDI	índice de polidispersidad
Clf	Cloroformo
MetOH	Metanol
Rpm	Revoluciones por minuto
PLGA	ácido poliláctico-co-glicólico
MCD	péptido desgranulador de mastocitos
EGCG	galato de <i>epigallocatequina</i>

RESUMEN

La encapsulación de ingredientes activos en nanopartículas coloidales tiene un enorme potencial para la administración de compuestos. Recientemente se ha implementado la encapsulación aplicada a activos naturales para brindarles mayor estabilidad y biodisponibilidad. En el presente estudio se evaluaron dos formulaciones de nanopartículas encapsulando activos naturales, el primero de ellos la melitina péptido que se encuentra en el veneno de la abeja y se ha informado que tiene potencial como terapia contra el cáncer. Sin embargo, la aplicación terapéutica es limitada debido a su principal efecto secundario, la hemólisis. Y el segundo activo encapsulado fue la Avenantramida C, un polifenol presente en el grano de avena que ha mostrado una fuerte actividad antioxidante y anti proliferativa tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, su estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad limitadas, obstaculizan su uso. En el presente estudio, se formularon nanopartículas de ácido poli-D, L-láctico-co-glicólico (PLGA) cargadas con melitina tetramérica y Avenantramida C, observando una eficiencia de encapsulación del 85 y 55 % respectivamente, se analizó la actividad biológica de ambas formulaciones obteniendo para el caso de la melitina una disminución de la hemólisis en un 20% y para Avenantramida C una liberación estable del 86% del activo encapsulado en las nanopartículas.

ABSTRACT

The encapsulation of active ingredients in colloidal nanoparticles has a high potential for the administration of compounds. Encapsulation applied to natural active compound has been implemented to provide greater stability and bioavailability. In the present study, two nanoparticle formulations encapsulating natural active ingredients were evaluated, the first of them the melittin peptide found in bee venom and has been reported to have potential as a cancer therapy. However, therapeutic application is limited due to its main side effect, hemolysis. And the second encapsulated active ingredient was Avenanthramide C, a polyphenol present in oat grain that has demonstrated a strong antioxidant and anti-proliferative activity both in vitro and in vivo, however, its limited stability, solubility and bioavailability hinder its use. In the present study, nanoparticles of poly-D, L-lactic-co-glycolic acid (PLGA) charged with tetrameric melittin and Avenanthramide C were formulated, observing an encapsulation efficiency of 85 and 55% respectively, the biodynamic activity of Both formulations obtaining in the case of melittin a decrease in hemolysis by 20% and for Avenanthramide C a stable release of 86% of the active encapsulated in the nanoparticles.

1. INTRODUCCIÒN

La encapsulación de ingredientes activos en nanopartículas coloidales tiene un enorme potencial para la administración de medicamentos en la industria farmacéutica y cosmética. Consiste en atrapar un fármaco / compuesto dentro de un material portador, con el objetivo de mejorar algunas características fisicoquímicas de la sustancia encapsulada mientras se obtiene un suministro del activo más eficiente y controlado. La nanoencapsulación mejora el valor terapéutico de varias moléculas bioactivas sensibles, solubles o insolubles en agua, al mejorar su biodisponibilidad. Debido a las ventajas antes mencionadas, las nanopartículas (NP) se encuentran actualmente en varias etapas de evaluación de desarrollo y eficacia, con especial atención en materiales poliméricos biodegradables. Investigaciones han demostrado que estos nanoportadores presentan numerosas ventajas, como la estabilidad mejorada de compuestos sensibles, mayor eficacia del activo, liberación controlada y entrega específica. El polímero seleccionado para la investigación actual de NP fue Acido polilactico co-glicolico(PLGA) comúnmente utilizado en ensayos clínicos y aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), con la finalidad de encapsular dos moléculas bioactivas a las que se les ha estudiado actividad anticancerígena la primera de ellas; la melitina que es un pequeño péptido de 26 aminoácidos y 2847.5 Da que presenta una gran actividad hemolítica, se caracteriza por su capacidad para alterar la integridad de la membrana celular y lleva al colapso del gradiente electroquímico transmembranal y a la muerte celular por lo que se le ha considerados un atractivo candidato anticancerígeno debido a su amplio espectro de propiedades líticas. Sin embargo, debido a que también resulta tóxico para las células normales su potencial terapéutico se ve limitado si no se cuenta con un adecuado vehículo. y la segunda molécula bioactiva; la Avenantramida C que se ha clasificado como un polifenol por las características estructurales que presenta. Ha mostrado una fuerte actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo*, exhibe actividad antiinflamatoria y antiproliferativa lo que puede brindar protección adicional contra la enfermedad coronaria, el cáncer de colon y la irritación de la piel. Sin embargo, su estabilidad y solubilidad limitadas, a menudo combinadas con una biodisponibilidad deficiente, deben resolverse para que este compuesto sea capaz de responder a las crecientes demandas en el campo de la salud

2. ANTECEDENTES

2.1.-Nanopartículas y sus características fisicoquímicas

La nanotecnología es un campo de investigación conocido desde el siglo pasado. Desde que “nanotecnología” fue presentada por el Premio Nobel Richard P. Feynman durante su famosa conferencia de 1959 como una tecnología habilitadora que se ocupa de objetos de tamaño nanométrico (Feynman, 1960). Se espera que la nanotecnología se desarrolle en varios niveles: materiales, dispositivos y sistemas. El nivel de nanomateriales es el más avanzado en la actualidad, tanto en conocimiento científico como en aplicaciones comerciales. Hace una década, las nanopartículas se evaluaron en función de sus propiedades físicas y químicas como son: tamaño, carga y composición de la superficie ya que éstas tienen un impacto directo sobre el funcionamiento de la nanopartícula a nivel biológico. (Stark et al; 2015).

- a) El **tamaño** de las nanopartículas adecuadas para la administración sistémica con fines terapéuticos debe estar en el rango de 2 a 200 nm, para cruzar diferentes barreras biológicas, esto depende del tejido, el sitio objetivo y la circulación, es necesario diseñar nanopartículas que puedan escapar del proceso de extracción de pulmón, hígado, bazo y riñón y alcanzar eficazmente los tejidos objetivo. Sin embargo, las nanopartículas demasiado pequeñas son vulnerables a la excreción renal y la eliminación de los tejidos diana. El tamaño de las nanopartículas también afecta la absorción celular de ellas, característica que debe considerarse en el diseño de nanopartículas para aplicación biomédica. (Jo et al; 2015).
- b) La **carga superficial** es importante para determinar si las nanopartículas se agruparán en el flujo sanguíneo o se adherirán o si tienen la capacidad de interactuar con la membrana de las células con carga opuesta (Aithal et al; 2016). La carga superficial también determina la absorción celular, la biodistribución y la interacción con otros entornos biológicos. En general, se sabe que las nanopartículas cargadas positivamente se internalizan más fácilmente que las

nanopartículas neutras y negativamente cargadas. La carga de superficie catiónica es deseable ya que promueve la interacción de las nanopartículas con las células y, por lo tanto, aumenta la velocidad y el alcance de la internalización. Para la entrega dirigida, se requiere la persistencia de nanopartículas en la circulación sistémica del cuerpo.(Duan & Li, 2013).

- c) La **superficie que las compone**, tiene un impacto en.....esta puede ser modulada fácilmente por la elección de distintos componentes, esto se puede lograr mediante el recubrimiento superficial de nanopartículas con polímeros, tensioactivos hidrofílicos, copolímeros biodegradables con segmentos hidrófilos tales como polietilenglicol (PEG), óxido de polietileno, polioxámero, poloxamina y polisorbato 80 (Tween 80), uso de ligandos para dar direccionamiento, drogas específicas y cargas superficiales (Dominguez et al; 2015).

Sin embargo, se ha observado que las nanopartículas convencionales con superficie hidrofóbica son rápidamente opsonizadas y eliminadas masivamente por los macrófagos fijos de los órganos del sistema fagocítico mononuclear(Varenne et al; 2016). Por lo tanto, para aumentar el tiempo de circulación y la persistencia en la sangre, la superficie de las nanopartículas convencionales se modifica con diferentes moléculas como se mencionó anteriormente. Una de las estrategias reportada es el recubrimiento con polímeros hidrofílicos ya que estos pueden crear una nube de cadenas en la superficie de la partícula que repelerá las proteínas plasmáticas (Xu et al; 2015). El rendimiento de las nanopartículas *in vivo* está influenciado por sus características morfológicas entre ellas: esferas, elipsoides, varillas, discos, cubos y cilindros, siendo la forma y la orientación de las nanopartículas, cruciales para la naturaleza de la interacción entre la partícula y el entorno (K. Yang & Ma, 2010). Las nanopartículas modificadas en la superficie tienen propiedades antiadhesivas en virtud de la configuración extendida en la superficie de la partícula que actúa como barrera estérica, reduciendo el grado de eliminación por los macrófagos circulantes del hígado y promoviendo la posibilidad de experimentar un proceso de permeación mejorado, el mecanismo de liberación puede ser modulado por el peso molecular del polímero utilizado. Entre mayor sea el peso molecular del polímero, más lenta será la liberación *in vitro* de fármacos (Lovisolo et al; 2018). El diseño cuidadoso de estos sistemas de entrega con respecto al objetivo y la ruta de administración

puede resolver algunos de los problemas que enfrentan las nuevas clases de moléculas activas. El grupo de Lowman publicó una revisión sobre la síntesis, modificación de la superficie, entrega dirigida y características de liberación de nanopartículas biodegradables en la que mencionan las diferencias en porcentajes de absorción, tamaño, uso de distintos polímeros y la influencia de estos en la entrega de fármacos (Nagpal et al; 2010).

2.1.2 Las nanopartículas como sistemas de liberación

El suministro de sustancias activas o fármacos candidatos puede mejorarse utilizando nanoportadores terapéuticos y/o materiales inorgánicos. Hasta el momento, se han diseñado y desarrollado diversos sistemas de administración que incluyen liposomas, dendrímeros, polímeros y portadores de fármacos particulados incluyendo nanopartículas poliméricas, nanopartículas sólidas y nanotubos (Fig. 1) (Tabla1) (Wen et al; 2015; Kostarelos, 2010). Hay muchas razones detrás del desarrollo y el éxito de sistemas de suministro de fármacos, hace unos años, toda la atención se centró en nuevos desarrollos de varias formas de dosificación. Bajo estas circunstancias, el desarrollo de sistemas de suministro de fármacos en nanopartículas ganó un gran impulso.

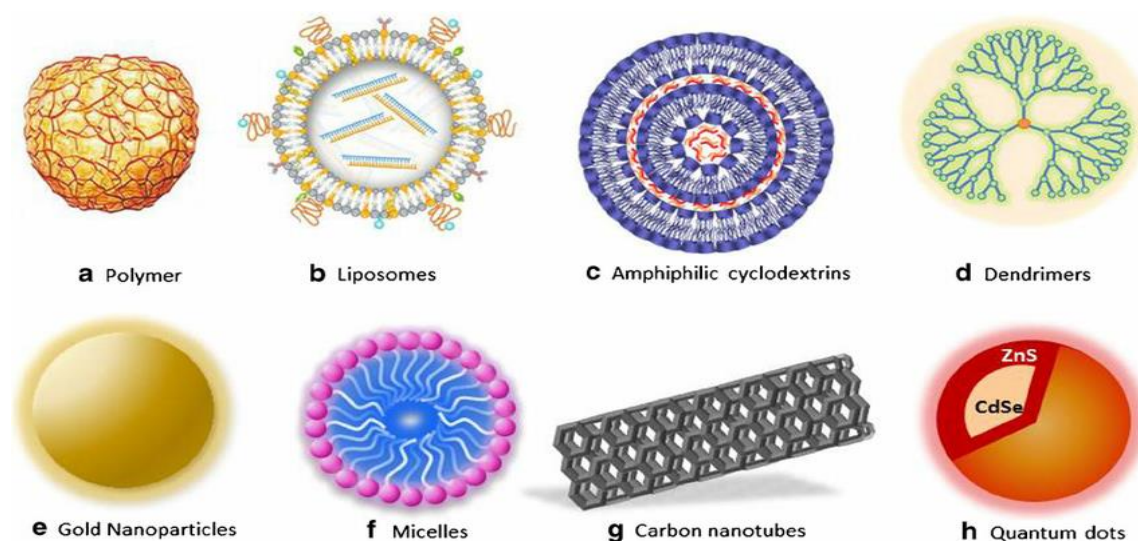


Figura 1. Esquema representativo de los diferentes tipos de nanopartículas comúnmente utilizadas para aplicaciones biomédicas y que ofrecen un potencial significativo en la administración de productos terapéuticos. Tomado de: (Mccarthy et al; 2014)

Tabla 1.- Características de los diferentes tipos de nanoportadores utilizados como sistemas de liberación.

Tipos de nanoportadores	Características
Liposomas	Vesículas esféricas compuestas de fosfolípidos y esteroides, aumentan la solubilidad de los medicamentos y mejoran sus propiedades farmacocinéticas, sin embargo, debido a su tamaño pueden activar la respuesta inmune.
Nanotubos de carbono	Partículas con forma cilíndrica nanoestructurada, similar a las láminas enrolladas de anillos de grafeno, son muy dinámicos y se usan potencialmente en el sistema de administración de fármacos, se les ha demostrado alta toxicidad
Micelas	Partículas coloidales que tienen un tamaño ajustable y funcionalidad superficial alta monodispersidad y excelente estabilidad, observándose en ellas citotoxicidad ocasional y necesidad de modificaciones superficiales
Dendrimeros	Estructuras ramificadas de tamaño nanométrico con uniformidad en el tamaño, buena biocompatibilidad y parámetros farmacocinéticos, sin embargo, se ha demostrado que tienen una muy compleja y costosa síntesis
Nanopartículas metálicas	Partículas formadas de material inorgánico con uniformidad en el tamaño, forma y longitud una ajustada farmacocinética y biodistribución, así como mayor área de superficie reportándose en estas elevada toxicidad.
Quantum dots	son nanomateriales inorgánicos, caracterizados como nanocristales semiconductores coloidales, la principal desventaja es que no pueden difundirse a través de las membranas celulares por lo que el proceso de entrega puede ser realmente peligroso
Ciclodextrinas	Son materiales derivados naturales que tienen forma de cono, con caras hidrofílicas primarias y secundaria y una cavidad hidrófoba. Sin embargo, posee baja solubilidad en agua lo que dificulta su aplicación
Polímeros	Las nanopartículas poliméricas se preparan a partir de productos naturales o sintéticos, son biodegradables y biocompatibles y se funcionalizan fácilmente con ligandos, aunque su uso podría ser difícil de escalar ha sido una alternativa preferida

Adaptado de: (Kahraman *et al*; 2017)

Las nanopartículas poliméricas biodegradables son mayormente preferidas porque son prometedoras en el sistema de administración de fármacos. Dichas nanopartículas proporcionan propiedades de tamaño subcelular, biocompatibilidad con tejidos y células además de una liberación controlada (Panyam & Labhasetwar, 2003). Aparte de esto, las nanomedicinas son estables en la sangre, no tóxicas, no trombogénicas, no inmunogénicas, no inflamatorias, no activan los neutrófilos, son biodegradables, evitan el sistema reticuloendotelial y son aplicables a diversas moléculas como fármacos, proteínas, péptidos o ácidos nucleicos (des Rieux et al;2006). Las nanopartículas representan un sistema portador alternativo a los portadores coloidales debido a que mejoran las propiedades farmacológicas y terapéuticas de los fármacos convencionales. La incorporación de moléculas en un sistema nanoportador pueden proteger a un medicamento de la degradación. Para la formación de las nanopartículas poliméricas se ha observado que los polímeros más utilizados son poli- α -caprolactona (PCL), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), polietilenglicol (PEG) y ácido polilactico-co-glicólico (PLGA), siendo este último uno de los polímeros más reconocidos por su capacidad de restauración y biocompatibilidad a través de vías naturales (Othman, 2014).

2.1.3 Nanopartículas de ácido polilactico- co -glicólico (PLGA)

Ácido polilactico-co-glicólico (PLGA) es uno de los nanosistemas biodegradables más exitosamente utilizados para el desarrollo de nanomedicinas porque se somete a hidrólisis en el cuerpo para producir los monómeros de metabolitos biodegradables, ácido láctico y ácido glicólico (Fig. 2) Dado que el cuerpo trata eficazmente con estos dos monómeros, existe una toxicidad sistémica mínima asociada con el uso de PLGA para la administración de fármacos o aplicaciones de biomateriales (Reis et al; 2006).

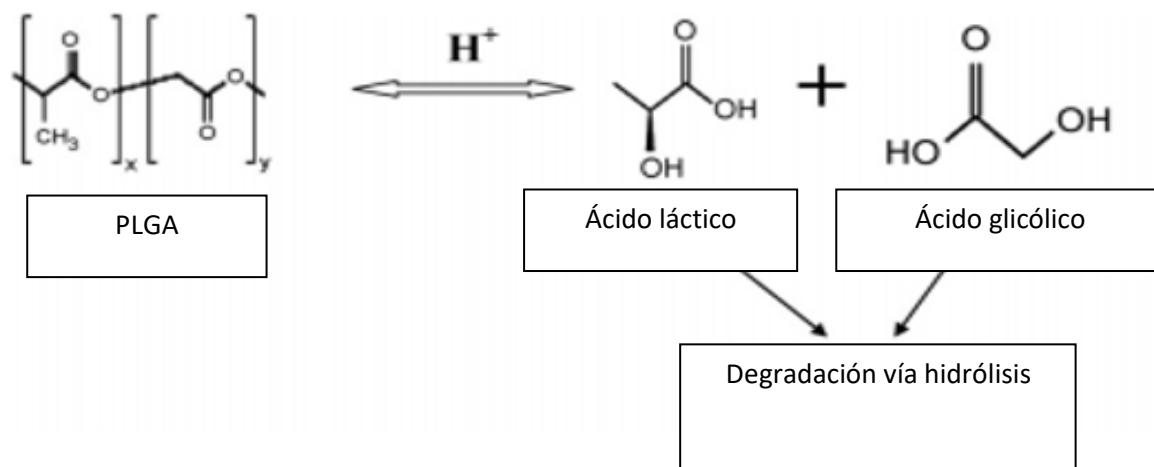


Figura 2. Hidrólisis de nanopartículas de PLGA: las nanopartículas de PLGA se hidrolizan biológicamente en medio ácido en ácido láctico y glicólico.

Las nanopartículas de PLGA se han preparado principalmente mediante emulsificación-difusión (Sahana et al; 2008), emulsión de solvente-evaporación (Zambaux et al; 1999) y método de nanoprecipitación (Barichello et al; 1999) (Tabla 2).

Tabla 2.- métodos de preparación de nanopartículas de Ácido polilactico-co- glicólico (PLGA)

Emulsificación-difusión	En este método una molécula se une a un surfactante y se disuelven en agua. La emulsión está compuesta por la dispersión de la fase acuosa en una fase orgánica, que presenta un polímero disuelto.
Solvente – evaporación	En este método se utiliza un solvente parcialmente soluble como acetona, en el que se disuelven polímeros o compuestos bioactivos, después, se emulsionan en una fase acuosa que contiene un estabilizador que evita la agregación de las gotas en la emulsión. Por último, se agrega agua a la emulsión para que se disuelva el solvente y se precipitan las nanopartículas
Nanoprecipitación	En este método las moléculas bioactivas y el polímero se disuelven en acetona y se añade una solución acuosa que contiene tensioactivos, la acetona es evaporada y las nanopartículas permanecen en una suspensión acuosa

Adaptado de: Madelein et al; 2018

Se ha demostrado que la formación de nanopartículas es altamente dependiente de los métodos de preparación, así como de los polímeros constitutivos. La experimentación sistemática ha demostrado que cambios sutiles en estas variables pueden conducir a distintas características morfológicas en las nanopartículas resultantes. La síntesis general y la encapsulación de nanomedicinas biodegradables se representan en la (Fig. 3). Las nanocápsulas poliméricas son sistemas vesiculares de tamaño coloidal en los que el fármaco está confinado a un depósito o dentro de una cavidad rodeada por un polímero, membrana o revestimiento. Las nanoesferas poliméricas pueden definirse como una partícula coloidal sólida de tipo matriz, en la que los activos se atrapan químicamente o se adsorben en la matriz polimérica constituyente de las mismas (Carrasquillo et al; 2001).

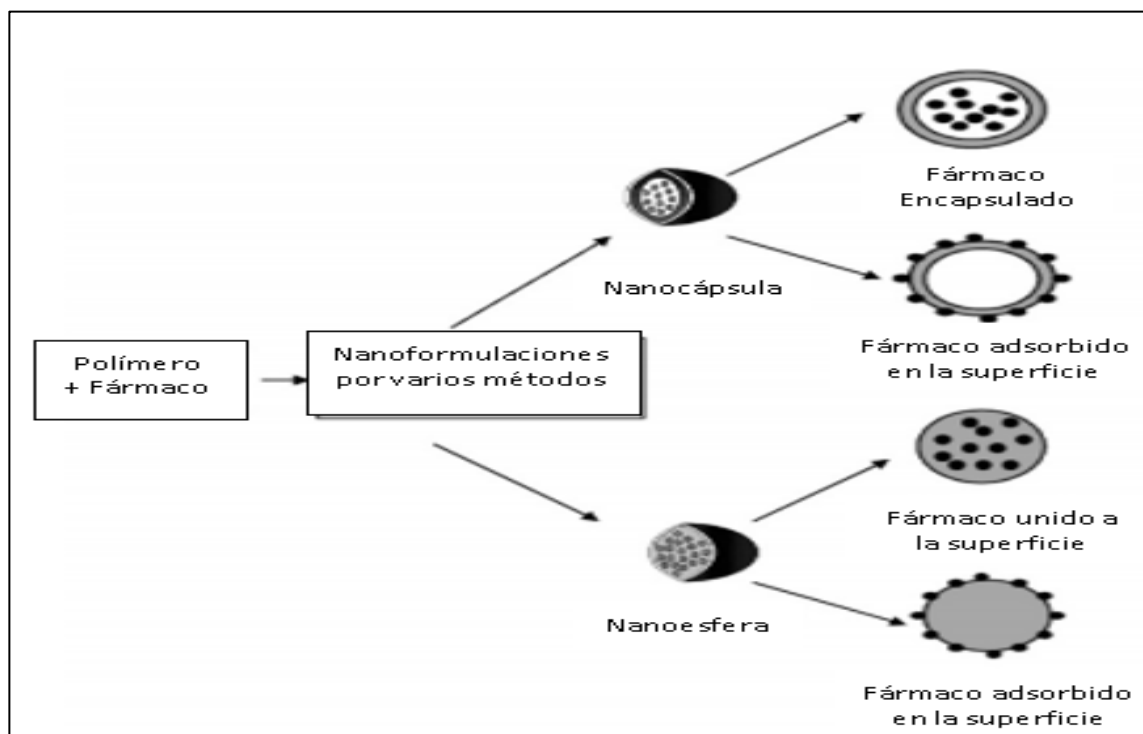


Figura 3. Tipo de nanopartículas de PLGA: nanocápsulas y nanoesferas. Las moléculas del fármaco están atrapadas en el interior o adsorbidas en la superficie. (adaptado de Tiyaboonchai, 2003).

2.1.4 Aplicaciones de las nanopartículas.

La nanotecnología ahora se usa con frecuencia para diversas aplicaciones en fibra y textiles (Perelshtein et al; 2008), agricultura (Casagrande et al; 2006), electrónica (D. Huang, Liao, Moles, Redinger, & Subramanian, 2003), ciencia forense (Choi et al; 2008), espacial (T. M. Liu et al; 2007) y terapéutica médica (des Rieux et al; 2008; Bender et al; 1996). Las nanopartículas biodegradables se utilizan con frecuencia para mejorar el valor terapéutico de varios medicamentos y moléculas bioactivas al mejorar la biodisponibilidad, la solubilidad y el tiempo de retención (Shenoy & Amiji, 2005). Estas formulaciones de nanopartículas y medicamentos reducen los gastos del paciente y los riesgos de toxicidad (Salamanca-Buentello et al; 2005). La nanoencapsulación de medicamentos (nanomedicinas) aumenta la eficacia, la especificidad, la tolerabilidad y el índice terapéutico de los medicamentos correspondientes (Kreuter, 2015; Raghuvanshi et al; 2002; Schroeder, Sommerfeld et al; 1998). Estas nanomedicinas tienen muchas ventajas en la protección de la degradación prematura y la interacción con el entorno biológico, la mejora de la absorción en un tejido seleccionado, la biodisponibilidad, el tiempo de retención y la mejora de la penetración intracelular (Alexis et al; 2008). Varios medicamentos o moléculas bioactivas relacionadas con la enfermedad se encapsulan con éxito para mejorar la biodisponibilidad, bioactividad y control de entrega (Gomez-Gaete et al; 2007). Existen nanomedicinas para el tratamiento de enfermedades como: cáncer (Mu & Feng, 2003), SIDA (Langer et al; 2000), diabetes (Damge et al; 2007), están en diferentes fases de pruebas y algunos de ellos ya se comercializan (K. S. Lee et al; 2008). En la nanomedicina la formulación depende de la elección del sistema polimérico adecuado para tener la máxima encapsulación (mayor eficiencia de encapsulación), el proceso de encapsulación con polímeros las nanopartículas son más avanzadas en comparación con otros sistemas de nanopartículas (van Vlerken et al; 2007). Estas nanoformulaciones de fármacos son superiores a la medicina tradicional con respecto al control de liberación, el suministro dirigido y el impacto terapéutico.

Algunas de las ventajas del uso de nanopartículas son:

- Disminución de la variabilidad de paciente a paciente.
- Solubilidad mejorada
- Mayor biodisponibilidad oral.
- Mayor velocidad de disolución.
- Mayor área de superficie
- Se requiere menor cantidad de dosis
- Inicio más rápido de la acción terapéutica.

Los avances recientes en nanotecnología han demostrado que las nanopartículas adquieren un gran potencial como portadores de compuestos (Shinde, et al;2012, Yadav et al;2013), sin embargo, Muchos compuestos bioactivos son altamente lipofílicos y muestran una solubilidad muy baja en agua, lo que dificulta su uso. Además, la baja solubilidad también significa una menor absorción en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, una biodisponibilidad limitada (Jørgensen *et al*, 2004). Por lo tanto, se ha hecho evidente que existe una necesidad apremiante de sistemas de entrega para encapsular, proteger y liberar compuestos bioactivos al desarrollar nuevos fármacos o tratamientos. La inmovilización de compuestos activos en la matriz de las nanoemulsiones contribuye de manera eficiente a:

1. Mejorar la dispersión de los compuestos bioactivos en soluciones acuosas, minimizando la tendencia a separar las diferentes fases (acuosa y lipídica).
2. Proteger los compuestos bioactivos de la interacción con otros compuestos, manteniendo sus propiedades funcionales y evitando el deterioro de estos.

En el campo de los compuestos bioactivos, actualmente se está realizando un trabajo extenso sobre la nanoencapsulación de activos naturales como compuestos con actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerígena, quimiopreventiva, y antiagregante (Đorđević et al;2015).

La búsqueda de terapias alternativas ha despertado un interés particular en componentes de origen natural con usos medicinales que sean más efectivos y menos tóxicos, algunos de los compuestos más empleados pueden observarse en la tabla 3.

Tabla 3.- ventajas de la encapsulacion de ingredientes activos

Ingrediente activo	Ejemplos	Potencial ventaja de encapsulación
Antimicrobianos	Aceites esenciales	Aumenta la compatibilidad de la matriz Retarda la degradación química
Antioxidantes	Tocoferoles, carotenoides, flavonoides, fenólicos	Incrementa la eficacia Retarda la degradación química Evita la autooxidación
Péptidos bioactivos	Péptidos de alimentos, plantas, animales	Retarda la degradación Reduce la astringencia Controla la liberación y bioactividad
Oligosacáridos y fibras	Probióticos, quitosan	Evita interacciones adversas con los ingredientes Mejora la textura liberación controlada en tracto gastrointestinal
Minerales	Hierro Calcio	Evita la autooxidación Previene la precipitación
Vitaminas	Vitaminas A, D, E, C	Previene la degradación química Facilita la incorporación en medio acuoso
Lípidos bioactivos	Conjugados de ácido linoleico	Facilita la incorporación en medio acuoso Evita la degradación química

Adaptado de: (Ventola, 2017)

A continuación, se profundizará en el empleo de algunos de ellos.

2.2 Uso de venenos animales en la medicina

Las toxinas de los animales venenosos son selectivas y potentes para los procesos fisiológicos vitales en los animales presa. Como resultado, los venenos son una verdadera mezcla de componentes biológicamente activos, que incluyen neurotoxinas, miotoxinas, enzimas y sustancias que inducen dolor, por lo tanto, no es sorprendente que la investigación centrada en identificar compuestos para el desarrollo de nuevas terapias ha incluido durante mucho tiempo un enfoque en los venenos de animales.

Usar venenos como fuente de fármacos no es una idea nueva las civilizaciones antiguas los utilizaban en la producción de brebajes y curaciones(Utkin, 2015). De los venenos animales, los provenientes de abejas, escorpiones, arañas, hormigas entre otros, han demostrado ser muy importantes como fuentes de fármacos para la medicina moderna, ya

que tienen propiedades inmunológicas, analgésicas, antibacterianas, diuréticas, anestésicas y antirreumáticas.

Oldfield y Yamakawa registraron que alrededor del 4% de los extractos evaluados en la década de 1970 de 800 especies incluyendo insectos mostraron además de los usos ya mencionados, cierta actividad anticancerígena (Oldfield ML, 1998; Yamakawa, 1998). Desde la primera identificación hasta hoy, se han identificado y estudiado cientos de extractos, ya sea de fuentes naturales o de diseños in silico, estos péptidos se caracterizan por una secuencia de aminoácidos generalmente de 5 a 50 residuos, alta hidrofobicidad y carga neta positiva (Felício et al; 2017)

2.2.1 El veneno de abeja

De todos los eventos de picaduras o mordeduras de insectos venenosos, los que la mayoría de nosotros conocemos son los de las abejas. El veneno de estas ha sido utilizado desde la antigüedad en la medicina oriental para tratar diversas enfermedades, incluidas la artritis, el reumatismo, las enfermedades inflamatorias y las enfermedades de la piel (Pak, 2016; HAIT & LEE, 1988). El veneno de abeja es producido por una glándula localizada en la cavidad abdominal de las abejas que contiene varios compuestos activos, incluidos: melitina (el componente principal), apamina, adolapina, el péptido desgranulador de mastocitos (MCD), enzimas (fosfolipasa A2 e hialuronidasa), así como componentes no peptídicos, como la histamina, la dopamina y la noradrenalina, entre otros los cuales tienen una variedad de propiedades farmacéuticas (Zhang et al; 2018; Son et al; 2007). Además, en estudios recientes se ha demostrado que el veneno de la abeja presenta otras cualidades como la inducción de apoptosis, necrosis y efectos sobre la proliferación, citotoxicidad, crecimiento e inhibición de diferentes tipos de células cancerosas (Oršolić, 2012).

2.2.2 Características de la melitina

La melitina consiste principalmente en un péptido de 26 aminoácidos sin puentes disulfuro en el que la parte N-terminal (residuos 1-20) de la molécula es predominantemente hidrófoba, mientras que la C-terminal (residuos 21-26) es hidrófila y muy básica; tiene 2847.5 Da de peso molecular, su secuencia aminoacídica es: Gly-Ile-

Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln (Terwilliger, Weissman, & Eisenberg, 1982) (Fig 4) La melitina, como otros péptidos y proteínas de unión a membrana, es predominantemente hidrófoba. Sin embargo, el péptido tiene una carga neta de +6 a pH fisiológico, cuatro de los cuales están en un tramo en la región terminal C (Lys-Arg-Lys-Arg) y los dos restantes en la región terminal N, Lys- 7 y el grupo N-terminal (Gly-1).

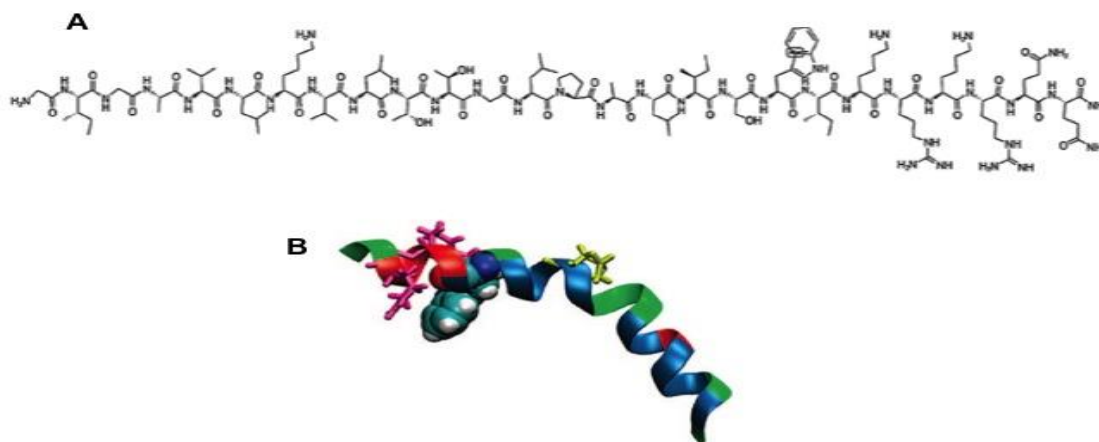


Figura 4. Estructura de la melitina. (A) Secuencia de aminoácidos (B) Estructura secundaria de la melitina en azul se muestra el triptófano, en amarillo la prolina y en rosa los aminoácidos básicos lisina y arginina.

Aunque la melitina tiene una alta proporción de aminoácidos no polares, es altamente soluble en agua. A baja concentración, la melitina es monomérica y adopta esencialmente una conformación aleatoria en solución acuosa. Sin embargo, se ha observado que adopta una conformación alfa- helicoidal y se agrega en tetrámeros dependiendo de varios factores como el incremento en la concentración de sal, alta concentración de melitina e incremento en el pH. (Liao et al; 2015; Dempsey, 1990) los cuatro monómeros de melitina en el tetrámero tienen una conformación casi idéntica, cada cadena de melitina está compuesta por dos segmentos α - helicoidales los cuales finalmente toman la forma de una horquilla (Pino, 2018; Bell, 1978; Knöppel et al, 1979).

Cuando se acumulan varios péptidos de melitina formando agregados tetraméricos en la membrana celular, el empaquetamiento de fosfolípidos es gravemente interrumpido, lo que conduce a la lisis de membranas tanto naturales como sintéticas (Pino, 2018; Belloet al; 1982). La melitina desencadena la lisis de una amplia gama de membranas plasmáticas

y aunque la melitina es el péptido del veneno de abeja más estudiado es un péptido citolítico con baja especificidad que ataca todo tipo de membranas, lo que ocasiona que su aplicación aún se vea limitada. La melitina es un candidato muy atractivo para la quimioterapia del cáncer porque las células cancerosas son menos propensas a desarrollar resistencia contra las moléculas capaces de formar poros en una membrana. La combinación de un fármaco quimioterapéutico junto con la melitina podría tener un efecto sinérgico reduciendo de este modo la dosis terapéutica requerida de cualquiera de los dos (Pan et al, 2011; Hui et al; 2002;) aunque la posible aplicación de la melitina como agente quimioterapéutico contra el cáncer ha sido ampliamente reconocida, la rápida degradación del péptido en la sangre y su baja especificidad lítica celular plantean desafíos significantes. Hasta la fecha se ha demostrado que la melitina es tóxica para las células del sistema hematopoyético incluyendo linfocitos y eritrocitos y su toxicidad también se ha observado en células intestinales (Y. J. Lee et al; 2007).

2.2.3 Propiedades anticancerígenas de la melitina

Havas, 1950 fue uno de los primeros que informó el efecto anticancerígeno de la melitina, años después, Mufson et al; 1979 señalaron que la melitina podría entrar en las bicapas de fosfolípidos y exhibir actividad tensioactiva, en 1985 Hait et al. mostraron por primera vez el efecto inhibitorio de melitina *in vitro*, pues ellos demostraron que la melitina fungía como inhibidor de calmodulina y podía inhibir el crecimiento y la clonogenicidad de las células de leucemia humana. En el mismo año, Hait y Lee, 1988 también notaron el efecto inhibitorio del péptido sobre el crecimiento de las células de astrocitoma, mientras que Lazo et al, 1985 observaron un mecanismo de acción similar en las células leucémicas. En 1986 Killion y Dunn demostraron que las células de leucemia eran más susceptibles a la melitina que las células normales de bazo y médula ósea de ratón. La razón es que las células de la médula ósea tienen varios sitios de unión en la membrana para los carbohidratos, los cuales tienden a desaparecer en las células del bazo de adultos, mientras que casi han desaparecido después de cambios neoplásicos, lo que podría hacer que las células tumorales sean más sensibles a la melitina. Zhu y colaboradores en 1991 observaron que la melitina no impide el crecimiento de células normales en una

concentración en la cual evita la proliferación de células tumorales tales como las células de cáncer de pulmón. Estas diferencias en la respuesta de las células indican una diferente activación de las vías de señalización entre las células normales y tumorales. La melitina ha demostrado ser especialmente eficaz contra las células de fibroblastos en cultivo que expresan altos niveles del oncogén Ras. También aumenta la activación de fosfolipasa A₂ (PLA₂) en las células transformadas por oncogenes Ras, lo que resulta en la destrucción selectiva de estas células. En conjunto, estos resultados sugieren que el aumento de la activación de PLA₂ por la melitina podría ser el objetivo de la citotoxicidad contra las células tumorales (Son et al; 2007) Es importante señalar que, uno de los principales problemas de la terapia anticancerígena es la elevada concentración de las sustancias químicas que se emplean, ya que pueden causar serios efectos secundarios, por lo que resulta obvio que la administración de fármacos debe ser mejor y más específica. La melitina como la mayoría de péptidos líticos producidos por insectos, tienen propiedades anfipáticas que se caracterizan por su capacidad para alterar la integridad de la membrana celular, ya sea por la creación de defectos en ella, su permeabilización o bien mediante la formación de poros, cualquiera que sea el mecanismo, el rompimiento de esta bicapa lipídica finalmente lleva al colapso del gradiente electroquímico transmembranal y a la muerte celular (Holle et al; 2015; Binggeli et al, 1980; Binggeli et al, 1985; Moon et al; 2006; Son et al; 2007) En contraste con las células normales que presentan un bajo potencial de membrana, las membranas de las células tumorales tienen un gran potencial de membrana. Así es como muchos péptidos líticos alteran selectivamente la estructura de la membrana de las células tumorales en mayor medida que la membrana de las células normales. Por lo tanto, la melitina es un atractivo candidato anticancerígeno debido a su amplio espectro de propiedades líticas ya que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral e inducir la apoptosis y necrosis de varios tipos de células cancerígenas (Hu et al; 2006; Yang et al; 2005) A pesar de este enfoque intensivo, la transición exitosa de los componentes del veneno a agentes terapéuticos es lenta pues la aplicación de melitina en el cáncer ha tenido un éxito limitado debido a varios problemas que incluyen toxicidad, nula especificidad, degradación, entrega sistémica ineficiente, biodisponibilidad limitada y hemólisis (Bei et al; 2015; Pan et al; 2011; Soman et al; 2009; Soman et al; 2008). Para

sortear el problema con el uso de este péptido en la terapia contra el cáncer, se han utilizado múltiples enfoques, los cuales se detallarán más adelante.

En la búsqueda de tratamientos alternativos para enfermedades, además del uso de péptidos como la melitina, existen otros compuestos naturales (fitoquímicos) que han sido encapsulados en nanopartículas como fitoquímicos provenientes en su mayoría de plantas que suelen estudiarse por su actividad antioxidante (Ventola, 2017).

2.3 Uso de fitoquímicos de alimentos en la medicina

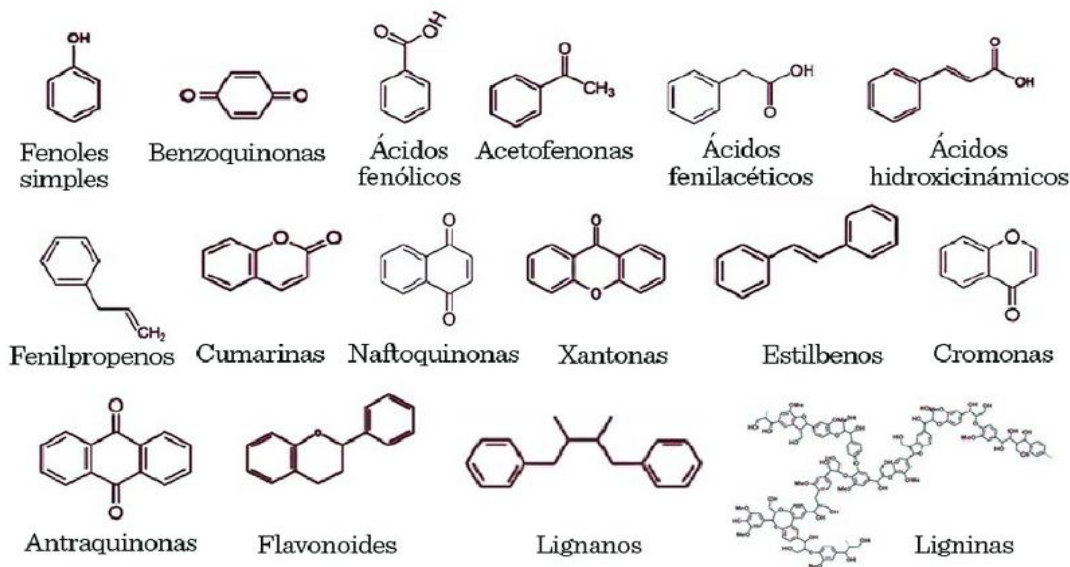
El término "fitoquímicos" se refiere a los compuestos bioactivos no nutrientes presentes en la dieta basada en plantas. Numerosas líneas de investigación indican que diferentes fitoquímicos en sinergia con una gama de nutrientes, vitaminas, minerales y fibra presentes en los alimentos derivados de plantas, poseen propiedades preventivas de enfermedades. Se ha demostrado que los fitoquímicos poseen propiedades anticancerígenas y antimutagénicas, por lo que pueden desempeñar un papel importante en la disminución de los diversos tipos de neoplasia (Ginter, 2008; Ginter & Simko, 2015; Kapinova et al; 2018) Se han identificado más de 5000 fitoquímicos individuales en alimentos derivados de plantas, como frutas, verduras y granos, aunque se estima que todavía se desconoce un gran porcentaje de fitoquímicos (R. H. Liu, 2004). Estos compuestos se pueden clasificar según su estructura química como polifenólicos, carotenoides, alcaloides, compuestos que contienen nitrógeno y compuestos organosulfurados (Golubnitschaja, 2007; R. H. Liu, 2004). De estos, los grupos más estudiados son los carotenoides, compuestos organosulfurados y polifenólicos. Los carotenoides se propagan ampliamente en los alimentos, son compuestos solubles en lípidos y proporcionan color (Tanaka et al; 2012). Los carotenoides, junto con las clorofilas, tienen papeles importantes en la fotosíntesis y la fotoprotección en tejidos vegetales de organismos fototróficos (R. H. Liu, 2004; Takaichi, 2011). Este beneficio también está asociado con su actividad antioxidante en la salud humana (R. H. Liu, 2004).

Los compuestos organosulfurados representan una clase importante de sustancias bioactivas de origen vegetal con una amplia gama de supuestos beneficios para la salud.

Basado en varios ensayos epidemiológicos y clínicos, estos compuestos han demostrado tener actividad anticancerígena a través de mecanismos de acción diversos (Angelino et al, 2014; Ota et al; 2012; Singh, et al;2012). Sus efectos protectores contra la carcinogénesis se mostraron también en estudios *in vitro* demostrando sus efectos antiproliferativos en varias líneas celulares tumorales y que están significativamente involucrados en el metabolismo del estrógeno (Auborn et al; 2003; Meng et al; 2000; Pedras, Jha, & Ahiahonu, 2003).

Los polifenoles son compuestos que se derivan del metabolismo secundario de las plantas a través de la vía fenil-propanoide. La característica general de los polifenoles es que tienen anillos aromáticos con grados de hidroxilación variable y la mayoría se encuentran en forma conjugada con uno o más restos de azúcares unidos a grupos hidroxilo o directamente al anillo aromático, incluso pueden encontrarse asociados a otros compuestos. La diversidad estructural deriva en una amplia gama de polifenoles (Fig 5) (Del Rio et al; 2013).

Figura 5. Estructura química básica de las principales clases de polifenoles.



Tomado de:(Lizárraga et al; 2018)

Los polifenoles pueden clasificarse en 4 grupos principales:

- 1) Flavonoides: Estos representan alrededor del 60% de todos los polifenoles. Los ejemplos incluyen quercetina, kaempferol, catequinas y antocianinas, que se encuentran en alimentos como manzanas, cebollas, chocolate negro y repollo rojo.
- 2) Ácidos fenólicos: Este grupo representa alrededor del 30% de todos los polifenoles. Los ejemplos incluyen estilbenos y lignanos, que se encuentran principalmente en frutas, verduras, granos enteros y semillas.
- 3) Amidas polifenólicas: Esta categoría incluye capsaicinoides en chiles y avenantramidas en avena.
- 4) Otros polifenoles: Este grupo incluye resveratrol en vino tinto, ácido elágico en bayas, curcumina en cúrcuma y lignanos en semillas de lino, semillas de sésamo y granos enteros (Zhou et al., 2016).

La cantidad y el tipo de polifenoles en los alimentos dependen de los alimentos, incluido su origen, madurez y cómo se cultivaron, transportaron, almacenaron y prepararon, estos tienen varias funciones esenciales en la reproducción y el crecimiento (Bhattacharya et al; 2010). Además, actúan como mecanismos de defensa contra patógenos, parásitos y depredadores; como atrayentes para polinizadores y animales dispersantes de semillas, protectores UV y moléculas señalizadoras en la formación de nódulos radicales fijadores de nitrógeno; y como contribuyente al color de las plantas (Del Rio et al; 2013; R. H. Liu, 2004). Los atributos protectores de los compuestos polifenólicos se deben a la alteración de numerosas vías de señalización celular involucradas en la carcinogénesis, como el ciclo celular (W. Zhang et al; 2013), la apoptosis (Ma et al; 2008) o la angiogénesis (Garvin et al; 2006). Los mecanismos a través de los que los compuestos polifenólicos pueden prevenir enfermedades no están aun definitivamente establecidos. Sin embargo, varios estudios de laboratorio realizados en animales de experimentación han puesto de manifiesto efectos y actividades biológicas muy variadas, que se resumen en la Tabla 4. Se han estudiado un sin número de compuestos polifenólicos desde el resveratrol, curcumina, galato de epigallocatequina (EGCG) y berberina, hasta compuestos encontrados en algunos granos como la avena que contiene compuestos polifenólicos solubles únicos de bajo peso molecular que no están presentes en otros granos de cereales conocidos como avenantramidas (Batra & Sharma, 2013).

Tabla 4. Efectos benéficos atribuidos a los compuestos polifenólicos.

Efectos	Ejemplo
Actividad Antioxidante	-Correlación entre polifenoles y actividad antioxidante total. - Inhibición de la oxidación de LDL -Protección del ADN del daño oxidativo.
Actividad Antimicrobiana	-Inhibición del crecimiento de <i>Clostridium</i> spp; <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp; <i>Staphylococcus</i> spp.
Actividad Antiinflamatoria	-Modulación de la expresión génica proinflamatoria, como lipoxigenasa, óxido nítrico sintetasa. -Efectos beneficiosos en el tratamiento de la isquemia y las enfermedades neurodegenerativas.
Efectos prebióticos	-Favorecen el aumento de los recuentos de <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i> .
Vasodilatación	-Disminución de la presión arterial.

Adaptado de: (Kizilkaya et al; 2013)

2.3.1 Avenantramidas metabolitos secundarios de la avena

La avena (*Avena sativa* L.) es una planta de 1.5 m de altura, ampliamente cultivada en zonas frescas y húmedas en regiones del norte de Europa y América del Norte (Rasane et al; 2013). Después de retirar la cáscara externa no comestible, los granos de avena restantes se procesan para obtener harina de avena, que contiene salvado de avena de forma natural. La avena se consume principalmente como hojuelas de avena, cereales para el desayuno y productos horneados, el interés en la avena se debió principalmente a su ventajosa composición de macronutrientes que incluye lípidos con un alto grado de insaturación y fibras con alto contenido de β -glucanos (Perrelli et al; 2018). Pero también, la evidencia científica ha demostrado que la avena contiene otros compuestos bioactivos importantes, como amidas polifenólicas conocidas como avenantramidas (Avns). Se han

identificado y clasificado según su estructura, alrededor de 40 Avns que consisten en ácido antranílico y derivados del ácido hidroxicinámico (Fig.6). (Collins, 1989).

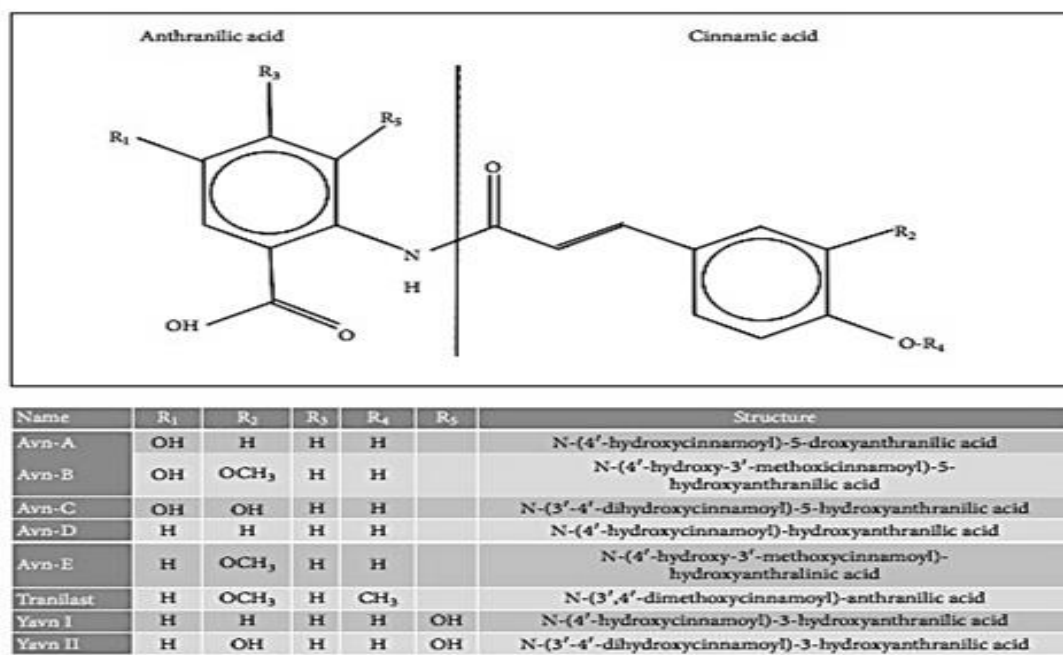


Figura 6. Estructura química y nombre de algunas Avenantramidas naturales (Avns), sintéticas (Tranilast) y recombinantes (YAvn). Avns son compuestos polifenólicos de bajo peso molecular formados por un ácido antranílico unido a un ácido hidroxicinámico mediante enlace amida. Se han descrito diferentes formas de Avns se han extraído de la avena, producido por síntesis química o generadas de manera recombinante en levadura. (Tomado de Pirrelli *et al.*, 2018).

Las Avns son fitoalexinas de bajo peso molecular que se encuentran en las hojas, semillas, durante la germinación, predominantemente en la capa de salvado y sub-aleurona de los granos de avena. (Rasane et al; 2015). Estos compuestos polifenólicos se producen en respuesta a la infección / inoculación por hongos corona (*Puccinia coronata* f sp. *Avenae*) o cuando las hojas de avena se tratan con varios inductores (p. ej: fragmentos de quitina, iones de metales pesados, vitamina C, iones de Ca, etc) (Nazareno et al; 2018). Por lo tanto, las Avns son un grupo de metabolitos secundarios producidos por la avena para su defensa. Se han identificado isoformas de avenantramidas en avena, que varían en los sustituyentes de los anillos de ácido cinámico y ácido antranílico. Las principales isoformas son: avns A, B y C las cuales se han utilizado ampliamente. Estas tres isoformas principales han demostrado una amplia gama de beneficios para la salud con funciones

antiinflamatorias, antioxidantes y antiproliferativas (Figura 8) las cuales se resumen a continuación. (Pridals et al; 2018).

a) Propiedades antiinflamatorias:

Se ha reportado que las Avns exhiben efectos antiinflamatorios debido principalmente a que interactúan con IkB quinasa β (IKK β); esta interacción produce respuestas inflamatorias reducidas en las células del músculo esquelético. Kang y colaboradores sugieren que las Avns actúan como un inhibidor alostérico para modular la afinidad de IKK β por el complejo NF- κ B, reduciendo la actividad de la quinasa IKK β en respuesta a la estimulación del peróxido orgánico (hidroperóxido de tert-butilo (tBHP)), lo que conduce a la regulación posterior de la vía COX-2 / PGE2, así como la expresión de TNF α e IL-1 β . Estos datos indican que las Avns son inhibidores potentes de la respuesta inflamatoria mediada por NF κ B debido a la regulación negativa de la actividad de IKK β en las células C2C12. (Kang et al., 2018) Figura 7.

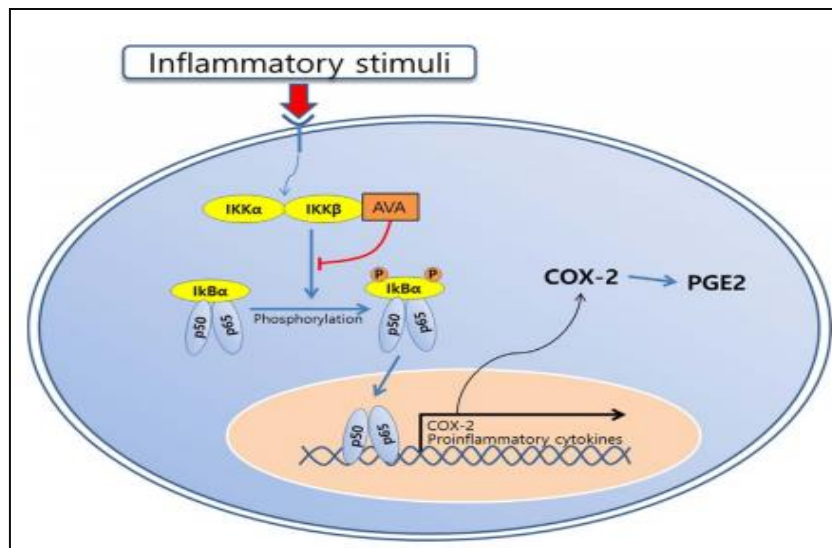


Figura 7. Breve descripción del papel de Avns en la inhibición de la actividad de la quinasa IKK β tomado de:(Kang et al., 2018)

b) Propiedades antioxidantes:

Las Avns exhiben potentes propiedades antioxidantes *in vitro e in vivo*, siendo esta actividad de 10 a 30 veces mayor que el de otros antioxidantes fenólicos. En diferentes estudios realizados se determinó el efecto antioxidante de Avns mediante dos ensayos *in vitro*: inhibición del blanqueamiento de β -caroteno (mide la habilidad de un antioxidante en esta ocasión de las Avns para inhibir la peroxidación lipídica) y eliminación del radical libre 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) ensayo utilizado para medir la capacidad del antioxidante (Avns) de atrapar radicales libres. Concluyendo que las Avns poseían actividad antioxidante en ambos sistemas, también se observó que las Avns mostraron alta actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica comparada con el antioxidante sintético estándar en el modelo de hígado graso inducido por ácido oleico *in vitro*. (Walters et al; 2018)

c) Propiedades antiproliferativas:

En su investigación Salvatore y colaboradores utilizaron dos líneas celulares de cáncer de colon CaCo-2 y de hígado HepG2 que muestran una alta resistencia a la apoptosis inducida por los fármacos anticancerosos convencionales para evaluar los efectos antiproliferativos de las Avns, observando que éstas inhiben la proliferación de células cancerosas a través de la activación de las caspasas 9, 8 y 3, además regularon negativamente los genes prosupervivencia BIRC5, HIF1A y VEGFA. (Salvatore et al; 2017).

Estos hallazgos sugieren que las avenantramidas proporcionan una amplia gama de beneficios para la salud, destacando que la Avns-C es a menudo la que comprende aproximadamente un tercio de la concentración total de Avns en el grano de avena (aunque la proporción relativa de Avns es muy variable), y la que ha mostrado la mayor actividad antioxidante *in vitro* (Multari et al; 2018).

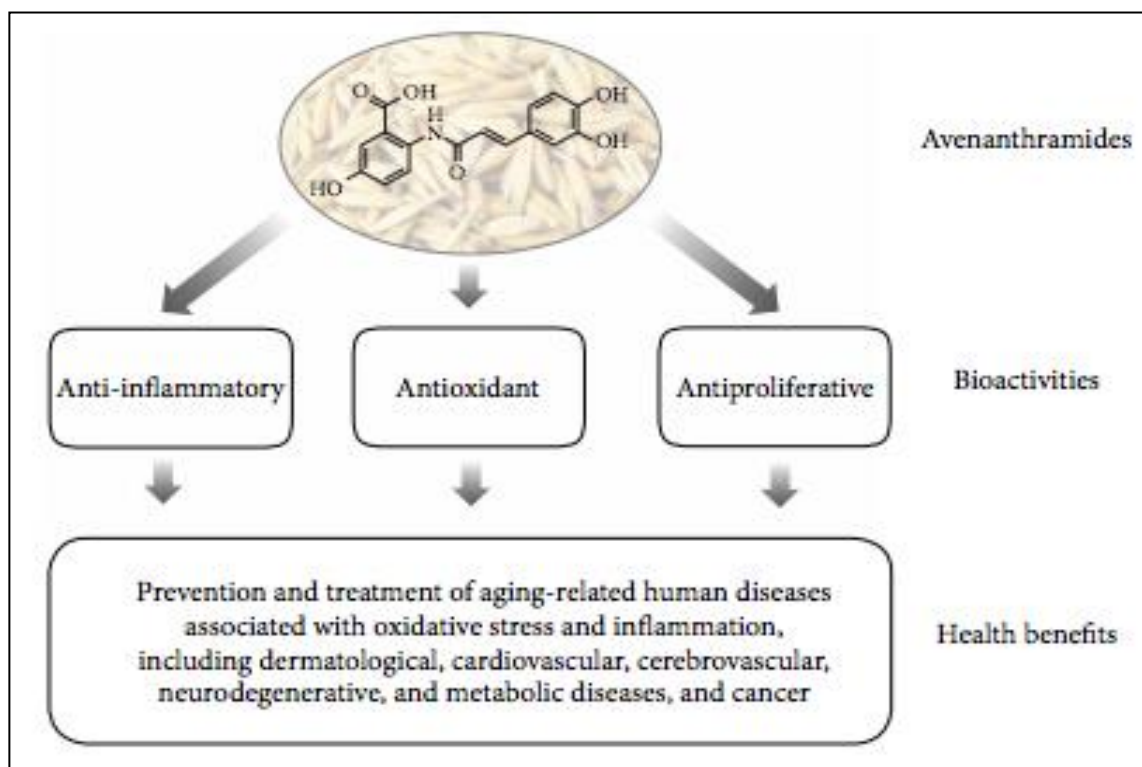


Figura 8. Funciones de las avenantramidas que generan beneficios para la salud. Tomado de: (Perrelli et al; 2018)

2.3.2 Avenantramida C

La estructura de la Avn-C se muestra en la figura 9 en la cual puede observarse que está compuesta de ácido 5-hidroxiantranílico y ácido cafeico con un peso molecular de 315.28 g/mol (Ryan T Koenig et al; 2011; Ryan Thomas et al; 2012). Es una molécula a la que se le han adjudicado múltiples efectos benéficos para la salud (Fig 10).

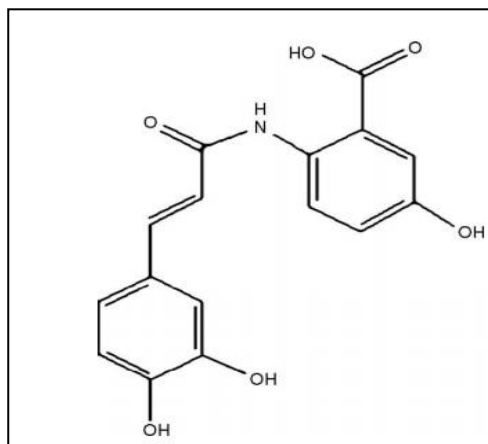


Figura 9. Estructura química de la Avenantramida – C

tomado de:(Bruijn et al; 2019)

Se ha observado que Avn-C exhibe potentes propiedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, aumentando la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en el musculo esquelético, el hígado y los riñones y mejora la actividad de glutatión peroxidasa en el corazón y musculo esquelético (C. Wang & Eski, 2019), en estudios realizados en ratas; la Avn-C atenúa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Peterson et al; 2002).

Además de demostrar actividad antioxidante, puede interactuar con los componentes celulares, no solo a través de su actividad antioxidante, sino también a través de sus interacciones con las vías moleculares y de señalización que modulan las respuestas celulares durante la inflamación (Meydani, 2009). Utilizando el sistema de cultivo de células endoteliales aórticas humanas (CEAH), se descubrió que los efectos potencialmente beneficiosos para la salud de la Avn -C están mediados por la modulación de los procesos celulares y moleculares que se sabe, juegan un papel importante en la inflamación de las arterias y el desarrollo de aterosclerosis. Se ha demostrado que este polifenol inhibe la expresión de las células de adhesión en las células endoteliales vasculares (L. Liu et al; 2004). Otro efecto biológico potencialmente interesante de Avn-C en el sistema cardiovascular sería su efecto sobre la vasodilatación dependiente de óxido nítrico (ON). Nie et al. 2006 informaron que la Avn -C aumenta la producción de ON y la expresión de ON sintasa endotelial por las células endoteliales. Este efecto podría

contribuir al aumento observado en la dilatación de los vasos sanguíneos y la reducción de la presión arterial después del consumo de avena (Katz et al; 2001; Saltzman et al; 2001). un informe proporcionó evidencia de que Avn-C puede ejercer un efecto calmante sobre la piel irritada. Sur et al, 2008 informaron que a concentraciones bajas Avn-C inhibió la activación de NF-kB en los queratinocitos y redujo la liberación de IL-8, una citocina proinflamatoria. Además, la aplicación tópica mitigó la inflamación en modelos murinos de hipersensibilidad de contacto e inflamación neurogénica y redujo el rascado inducido por puritrógeno en un modelo de picazón en ratones. Estas observaciones indican que Avn-C parece mediar los efectos antiinflamatorios y antiirritantes y que probablemente funciona a través de la inhibición de la señalización de histamina. En otra investigación realizada por Nie et al; 2006 estudiaron el mecanismo molecular de la inhibición de Avn -C de la proliferación de células del músculo liso vascular y demostraron que, a través de Modulación de proteínas reguladoras del ciclo celular tales como p53, p21cip1, p27kip1, ciclina-D1 y pRb, inhibe la señalización del ciclo celular en la transición de fase G1 a S. Se informó que Avn -C suprime la fosforilación de pRb, cuya hiperfosforilación es un sello distintivo de la transición de G1 a S en el ciclo celular. Esto fue acompañado por una disminución en la expresión de ciclina D1 y un aumento en la expresión del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21cip1. Además, el tratamiento con Avn-C aumentó el nivel de expresión y la estabilidad de la proteína p53, lo que podría explicar el aumento en la expresión de p21cip1. Además se examinaron los efectos antiproliferativos de Avn-C, esta mostró una alta bioactividad al inhibir el crecimiento de las células de cáncer de colon y prevenir el daño del ADN(Guo et al; 2010). Chen y colaboradores han explorado la actividad in vivo de Avn -C en grupos modelo de hámster para evaluar su capacidad antioxidante sobre la resistencia del colesterol LDL a la oxidación inducida por Cu, observando que la actividad antioxidante de Avn-C fue evidente a través de un aumento en la resistencia de las LDL dependiente de la dosis (Chen et al., 2004). En otro estudio, utilizando ratones, Wang y colaboradores observaron que Avn -C fue biotransformada en 8 metabolitos principales, utilizando también la microbiota humana para estudiar el metabolismo de Avn-C en cuyos resultados indican que se da la conversión de Avn-C en 2 metabolitos pero la composición de la microbiota

intestinal puede influir en el metabolismo y biodisponibilidad de esta, indican que esta biotransformación mantiene sus actividades farmacológicas (Wang et al., 2015).

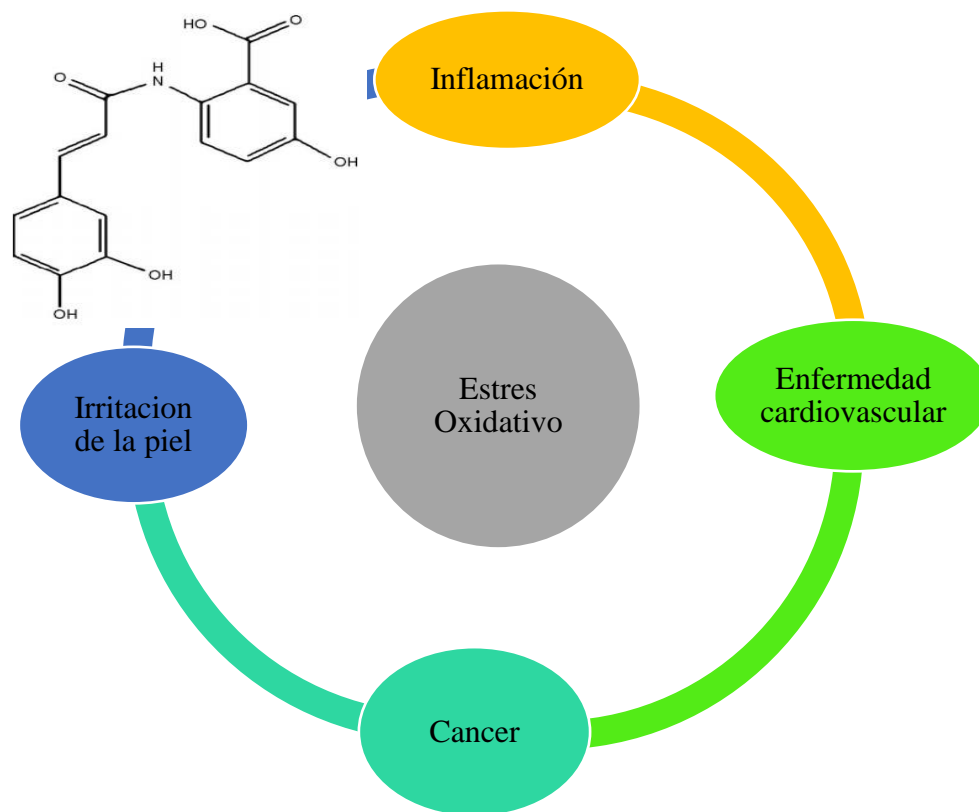


Figura 10: Beneficios de la Avenantramida - C

2.4 Actividad anticancerígena de la melitina y Avenantramida -C

Como se mencionó anteriormente, la selectividad y la especificidad de la melitina por células cancerígenas ha sido un reto para los científicos en su búsqueda de nuevos tratamientos contra el cáncer. En la tabla 5 se muestran algunas de las estrategias para mejorar la actividad biológica de la melitina y reducir su actividad hemolítica, muchos investigadores han estudiado la relación estructura-actividad, la modificación estructural de la melitina y la incorporación de esta en sistemas de transporte (Srivastava et.al, 2012; Walsh et al; 2011; Wu et.al , 2018; Sun et al. 2005) sin embargo los resultados sugieren que la melitina sigue conservando en porcentajes elevados sus características originales.

Tabla 5.-Modificaciones realizadas en el péptido melitina

Modificaciones realizadas	Resultados	Referencias
Síntesis de la secuencia inversa con triptófano en la posición 10	<ul style="list-style-type: none"> *significativamente citolítico. *Pérdida parcial de la actividad *La posición del triptófano es crucial para la actividad 	Srivastava et al; 2012
Cambio de lisina por serina posición 7. 4 aminoácidos truncos posición 23-27	<ul style="list-style-type: none"> *La modificación en el residuo 7 no tiene efecto relevante en su habilidad para lisar células de mamíferos *una secuencia básica en el C-terminal no es suficiente para unirse a la superficie celular al menos requiere una arginina para actividad lítica contra células de mamíferos *mantiene la naturaleza anfipática 	Walsh et al;2011
Cambio de los 6 últimos residuos del C-terminal al N- terminal	<ul style="list-style-type: none"> *esta modificación es la que más afecto la actividad citolítica reduciéndola hasta un 28% debido al cambio de polaridad de la molécula. *el triptófano tiene influencia en este cambio ya que solo penetra en un mínimo grado la membrana. *El C-terminal debe ser suficientemente catiónico para unirse a las cabezas de fosfolípidos de la membrana. *Aún no está bien establecida la importancia de las lisinas y argininas en la región C-Terminal 	Stankowski et.al; 1991
Identificaron un zipper de leucinas y sustitución por alaninas	Se reduce la hemolisis, mantienen su actividad antibacterial.	Oren & Shai, 1997
Modificación estructural de la melitina con lauril sulfato de sodio incorporada en nanopartículas	*La bioactividad de la melitina en la nanopartícula fue similar a la de la melitina libre, según lo verificado por pruebas tumorales in vitro.	Huang et al; 2003
Formulación de nanopartículas de perfluorocarbono y liposomas para la encapsulación de melitina “NanoBees”	<ul style="list-style-type: none"> *La melitina mantiene actividad hemolítica. *Toxicidad de la formulación no verificada 	Pan et al; 2011

En el caso de Avn- C, se ha observado que puede modular eventos involucrados en el desarrollo del cáncer Sin embargo, solo hay un par de ensayos clínicos realizados, en los que se ha observado presenta un potencial para intervenciones preventivas y terapéuticas, propiedades que dependen de su estructura química que proporciona actividad antioxidante y modula los eventos celulares y moleculares involucrados en múltiples etapas del desarrollo del cáncer, por lo tanto aun es necesaria la caracterización de su biodisponibilidad y distribución (Hassanein et al., 2017). Es bien sabido que los compuestos que exhiben propiedades farmacológicas prometedoras en ensayos *in vitro* a

menudo muestran un perfil farmacocinético desfavorable. Hasta la fecha, el perfil farmacocinético de la Avn-C aún no se ha investigado exhaustivamente. En estudios *in vivo* se destacó que se absorbe poco en el tracto gastrointestinal y muestra una biodisponibilidad baja (Marmouzi & Ezzat, 2018). Los estudios en humanos confirmaron esta biodisponibilidad limitada, además Turrini y colaboradores mencionan que los estudios realizados con Avn-C a la fecha aún no son suficientes para respaldar la eficacia de Avn -C en pacientes con riesgo de cáncer; por lo tanto este aspecto puede considerarse una ciencia emergente (Turrini et al; 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de activos naturales como una alternativa a los tratamientos de distintas enfermedades no es algo nuevo sin embargo, la aplicación de estos se sigue viendo obstaculizada por varios factores entre los cuales se encuentra su citotoxicidad, baja especificidad, degradación, biodisponibilidad limitada, hemólisis, autooxidación y precipitación, condiciones que se ven mejoradas con el uso de la encapsulación de estos compuestos en nanopartículas. Es por ello que en el presente trabajo se abordó el desarrollo de 2 formulaciones de nanopartículas de PLGA (ácido polilactico co-glicólico) la primera de ellas incorporando melitina en su conformación tetramérica (con el fin de disminuir su actividad lítica) y la segunda conteniendo Avn-C y evaluar la actividad biológica *in vitro* de ambas.

4. HIPÓTESIS

La incorporación de melitina tetramérica y Avn-C en nanopartículas de PLGA (ácido polilactico co-glicólico) no altera su actividad biológica *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Desarrollo de 2 formulaciones de nanopartículas de PLGA (ácido polilactico co-glicólico) incorporando melitina tetramérica y Avenantramida -C y evaluar su actividad biológica *in vitro*

5.2 Objetivos Específicos

1. Preparar y determinar las características fisicoquímicas de las nanopartículas poliméricas.
2. Cuantificar los compuestos (melitina, Avenantramida-C) presentes en las nanopartículas.
3. Obtener la cinética de liberación de las Nanopartículas encapsulando Avenantramida-C.
4. Evaluar la actividad biológica de las nanoformulaciones de (Melitina y Avenantramida -C) *in vitro*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias Genómicas y en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

La Melitina, la Avenantramida C y el PLGA se obtuvieron de Sigma Aldrich Inc. Los disolventes orgánicos, cloroformo (Clf) y metanol (MetOH) que se emplearon en el presente estudio fueron de calidad HPLC y proceden de J.T. Baker. El resto de los reactivos que se emplearon fueron de calidad analítica y procedieron de J.T. Baker.

6.2 Preparación del agregado de melitina

La melitina tetramérica se preparó colocando 1mg de melitina en 1 mL de buffer Hepes 20mM NaCl 250mM pH 7.4. Para mantener la conformación monomérica, el péptido se disolvió en 1mL de buffer Hepes 20mM pH 7.4 en ausencia de NaCl.

6.3 Caracterización de las formulaciones de nanopartículas de melitina y Avenantramida C

Las formulaciones de nanopartículas se caracterizaron mediante la evaluación del tamaño promedio de partícula y la homogeneidad de tamaño (índice de polidispersidad, PDI) por espectroscopia de correlación fónica Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, R.U.) a partir de una alícuota de cada lote diluida en agua Milli-Q.

Nanopartículas de melitina

6.3.1 Preparación de nanopartículas de Melitina

Para la preparación de las formulaciones de nanopartículas poliméricas se siguió el método de doble emulsión evaporación. Se preparo un reactor que contenía 1.5mL de una solución orgánica de acetato de etilo con 20mg de PGLA (75:25) ácido poliL-lactico- co- glicólico (sigma-aldrich chemical Ltd, Alemania M.W 24,000-38,000) y 20 mg de Lutrol 68 Mp (Poloxamer 188, BASF). A la mezcla anterior se le adicionó una solución acuosa de cloruro de magnesio al 3% p/p se agitó para formar una emulsión mediante agitación con ultrasonidos durante 90 s (Branson Ultrasonicss Corp, Danbury, CT, USA). A la emulsión formada se le adicionaron 5ml de agua bidestilada y se favoreció la formación de una emulsión múltiple mediante una segunda agitación de 90 s con ultrasonido. La formación de las nanopartículas se consiguió mediante la evaporación del disolvente a presión reducida con un rotavapor (Heidolph instruments GmbH & co, Alemania). Una vez formadas las nanopartículas se colocó un reactor sobre una placa de agitación conteniendo la formulación y a la misma se le adicionaron 200µg de melitina en solución.

6.3.2 Dicroísmo Circular

Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un espectropolarímetro J-1100 (Jasco, Easton, MD) equipado para mantener la temperatura constante a 25°C con un Koolance Peltier. Todos los espectros se registraron en el ultravioleta lejano (190-240nm) a una velocidad de 50nm/min, obteniendo el promedio de 5 espectros con una sensibilidad de 50mdeg. Todos los espectros se corrigieron restando los blancos correspondientes. Las mediciones se realizaron en una celda de 0.1cm con soluciones de melitina a [70mM] o bien de suspensiones de nanopartículas conteniendo 100mg de péptido por mL. Las muestras se equilibraron en buffer Hepes 5mM pH 7.4 El contenido helicoidal de las muestras se asumió era directamente proporcional a la elipticidad promedio por residuo (MRE) a 222nm $[\Theta]^{222}$. El contenido alfa-helicoidal se calculó usando la fórmula:

$$\max[\Theta]^{222} = -40,000 \times [1-2.5/h] + 100 \times T)$$

donde h es el número de residuos y T es la temperatura en °C (Jamasbi *et al.* 2014; Scholtz *et al.* 1991). El porcentaje de helicidad se calculó después como $100 \times [\Theta]^{222} / \max[\Theta]^{222}$

6.3.3 Cuantificación de la melitina presente en la superficie de las nanopartículas

La determinación del contenido de melitina en la superficie de las nanopartículas se realizó mediante el método de Bradford y por espectroscopía de fluorescencia. Para ello, la suspensión de nanopartículas recién preparadas se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 hr (Ultracentrífuga Beckman Coulter, Brea CA), se tomó 1 mL del sobrenadante y se cuantificó la cantidad de melitina presente por el método de Bradford. Para la cuantificación por espectroscopía de fluorescencia se tomó una alícuota del sobrenadante y del precipitado y se midió la fluorescencia emitida por el triptófano empleando una longitud de onda de excitación de 280 nm. La fluorescencia máxima obtenida se interpoló en una recta patrón realizada a partir de una solución estándar de melitina de concentración conocida.

Nanopartículas de Avenantramida C

6.3.4 Preparación de Avenantramida C

Para la preparación de la solución madre de avenantramida se colocó 1mg de avenantramida C en 1 mL de metanol, posteriormente se agito para disolver y se conservó en un frasco ámbar a -4°C

6.3.5 Preparación de nanopartículas de Avenantramida C

Para la preparación de las formulaciones de nanopartículas poliméricas se siguió el método de doble emulsión evaporación en donde 200µg de solución de avenantramida C

se adiciono a un reactor que contendrá 1.5mL de una solución orgánica de acetato de etilo con 20mg de PGLA (75:25) ácido poliL-lactico- co- glicólico (sigma-aldrich chemical Ltd, Alemania M.W 24,000-38,000) y 20 mg de Lutrol 68 Mp (Poloxamer 188, BASF). Se dejo en una placa de agitación hasta que se observó cristalina la solución, A la solución formada se adicionaron 500μ de agua bidestilada se formó una emulsión mediante agitación con ultrasonidos durante 90s (Branson Ultrasonicss Corp, Danbury, CT, USA). A la mezcla anterior se le adicionaron 5mL de buffer acetatos pH 3, se favorecerá la formación de una emulsión múltiple mediante una segunda agitación con ultrasonido durante de 90s. La formación de las nanopartículas se consiguió mediante la evaporación del disolvente a presión reducida con un rotavapor (Heidolph instruments GmbH & co, Alemania).

6.3.6 Cuantificación de la Avenantramida C presente en las nanopartículas

La cuantificación de la Avenantramida C encapsulada en las nanopartículas se realizó mediante método indirecto por espectroscopía a una longitud de onda de 520 nm. Para ello, la suspensión de nanopartículas recién preparadas se centrifugo a 12,000 rpm durante 2 hr (Ultracentrífuga Beckman Coulter, Brea CA), se tomó el sobrenadante y se cuantifico la cantidad de Avevantramida C presente en las mismas.

6.4 Microscopía de transmisión electrónica

Se tomaron 200 μL de la formulación de nanopartículas y se depositaron en un tubo eppendorf al cual se le agregaron también 800 μLde agua destilada, una vez realizado lo anterior, la suspensión se pasó por filtro de jeringa, Posteriormente se tomó un portamuestras para SEM al que se le adhirió cinta de grafito en la cual se depositaron 15 μL de la suspensión ya filtrada, se dejó reposar por 2 minutos y se procedió a retirar el exceso de agua con papel filtro, una vez realizado lo anterior se añadieron 10 μL de una solución de acidotungstico(20 mg/ml)se dejó reposar 2 minutos y posteriormente se retiró el exceso con papel filtro, una vez terminado el procedimiento se dejó en un disecador y se procedió a la observación de la muestra por SEM.

6.5 Cinética de liberación de la Avenantramida C

La liberación de la avenantramida C de las nanopartículas poliméricas se estudió colocando la formulación de nanopartículas alicuotada en tubos eppendorf y manteniendo la muestra a 37°C en un incubador con agitación, durante una semana se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo, se centrifugaron y se recolectó el sobrenadante el cual fue analizado espectrofotométricamente a 520 nm para analizar la presencia del polifenol.

6.6 Preparación de suspensiones multilamelares (MLV)

Para obtener vesículas lipídicas multilamelares se utilizó el método de evaporación-hidratación. Para ello, se dispuso en un tubo de ensayo los volúmenes adecuados de lípido, a partir de soluciones madre en Clf/MetOH 2:1. La mezcla así formada se secó bajo flujo de nitrógeno por 2 hr para eliminar las trazas de disolvente orgánico. La película seca de lípido se rehidrató en 1mL de tampón HEPES 50 mM pH 7 conteniendo NaCl 150 mM durante 2 h a 25°C con agitación constante empleando un Termomixer marca eppendorf. Este tratamiento es suficiente para obtener vesículas multilamelares (MVL). El modelo de membrana que se empleó en la realización de este trabajo fue: PC/PE/PA/PS (50:25:15:10 p/p) que representa el epitelio mamario cancerígeno.

6.6.1 Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUVs)

Para obtener suspensiones de LUVs de tamaño definido, las suspensiones de vesículas multilamelares preparadas por el método de evaporación-hidratación se pasaron 10 veces a través de un mini-extrusor de alta presión (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) equipado con una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 100 nm y termostatzado a la misma temperatura a la que se hidrataron los lípidos, obteniendo de esta forma una suspensión homogénea de vesículas lipídicas de unos 100nm de tamaño promedio.

6.7 Cuantificación de fosfolípidos

La cantidad de fosfolípido se determinó mediante valoración de fósforo según el método descrito por Rouser y colaboradores (1966) para lo cual se secaron las muestras a analizar bajo flujo de nitrógeno para posteriormente añadir ácido perclórico al 70% (0.45 mL) e incubarlas en baño de arena a 250-260°C durante 30 minutos con el fin de conseguir la mineralización del fósforo. Transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar los tubos y se añadieron 0.5mL de molibdato amónico (2.5% p/v), 0.5mL de ácido ascórbico (10% p/v) y 3.5 mL de agua bidestilada por muestra, incubándose éstas durante 7 minutos en baño de agua hirviendo. La reacción cromogénica se detuvo colocando los tubos en hielo, midiéndose la absorbancia a 820 nm del producto coloreado que se forma en presencia de fósforo, en un espectrofotómetro Génesis 10 Thermo-scientific. Para conocer la cantidad de fosfolípidos en cada muestra, la absorbancia obtenida se interpolará en una recta patrón realizada a partir de una solución estándar de concentración conocida de fosfato inorgánico (KH_2PO_4 0.05mg/mL).

6.8 Ensayos de liberación de contenidos acuosos

La capacidad del sistema nanoparticulado conteniendo melitina para provocar la pérdida de contenidos acuosos de vesículas fosfolípídicas de diferente composición se valoró mediante el método ANTS/DPX descrito por Ellens y colaboradores en 1985. Las vesículas de fosfolípido se prepararon mediante extrusión en HEPES 50 mM, pH 7 con NaCl 30 mM, ANTS 12.5 mM y DPX 45 mM. Una vez preparadas se pasaron a través de una columna Sephadex G-75 y se eluyeron con buffer HEPES 50 mM pH 7, NaCl 150 mM. El proceso cromatográfico se siguió midiendo la absorbancia de las fracciones a 259 nm y 353 nm, longitudes de onda de los máximos de absorción del desactivador y fluoróforo DPX y ANTS respectivamente. Las fracciones correspondientes a las vesículas con sonda y desactivador coencapsulados se recogieron y reunieron para determinar su concentración mediante el método de Rouser. El ensayo de liberación de contenidos se inició disponiendo 500 μL de la suspensión de vesículas conteniendo ANTS/DPX, a una concentración final de fosfolípido de 75 μM en la cubeta del espectrofluorímetro, termostatizada a 25 °C. Para iniciar el ensayo se inyectaron alícuotas de entre 10 y 50 μL

para obtener las cantidades de péptido requeridas (1.8, 2.5, 7, 10.7, 14 μ M) en la celda de fluorescencia. La liberación del contenido de las vesículas del ANTS se siguió monitorizando la emisión de fluorescencia del ANTS a 536 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 353 nm. La liberación del contenido de las vesículas va acompañada de un incremento en la intensidad de fluorescencia del ANTS, consecuencia de la reducción por dilución del efecto desactivador del DPX. El experimento se finalizará con la adición de una alícuota de Triton X-100 (0.5% concentración final) que proporciona la fluorescencia correspondiente al 100% de liberación como referencia.

6.9 Ensayos in vitro de las nanopartículas con Avn -C en la línea celular MCF-7

Se utilizaron líneas celulares de carcinoma humano de mama MCF-7, que una vez descongeladas, fueron cultivadas en frascos de 75 cc con medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con glucosa (4,5 g/l), Glutamax (4 mM) y Piruvato (1 mM), suplementado con 10 % de FBS (Suero Fetal Bovino) y antibióticos: 1 % de Estreptomicina/Penicilina y 0,1 % de Gentamicina (50 μ g/ml). Las nanopartículas Avn -C liofilizadas fueron disueltas en DMSO, solución madre de 1 mg/ml, y luego disueltas en el medio correspondiente al 1% de FBS.

7. RESULTADOS

7.1 Preparación del agregado tetramérico de melitina

La melitina es una molécula que en solución presenta una conformación aleatoria mientras que, al unirse el monómero a membranas se incrementa drásticamente su contenido alfa-helicoidal (Vogel y Jähnig, 1986). Para corroborar la presencia de la conformación tetramérica del péptido bajo las condiciones empleadas en este trabajo, se analizó por dicroísmo circular su estructura secundaria. En la figura 11 puede observarse que la melitina monomérica presenta un mínimo $\sim 205\text{nm}$ representativo de una conformación aleatoria mientras que, la melitina tetramérica presentó un pico de elipticidad negativo centrado en los 222nm característico de una conformación alfa-helicoidal originada por la auto asociación del péptido. Para corroborar que la conformación tetramérica de la melitina se mantenía una vez incorporado el péptido a las nanopartículas, se realizaron los espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano y además se siguió la intensidad de fluorescencia del Trp¹⁹ de la melitina.

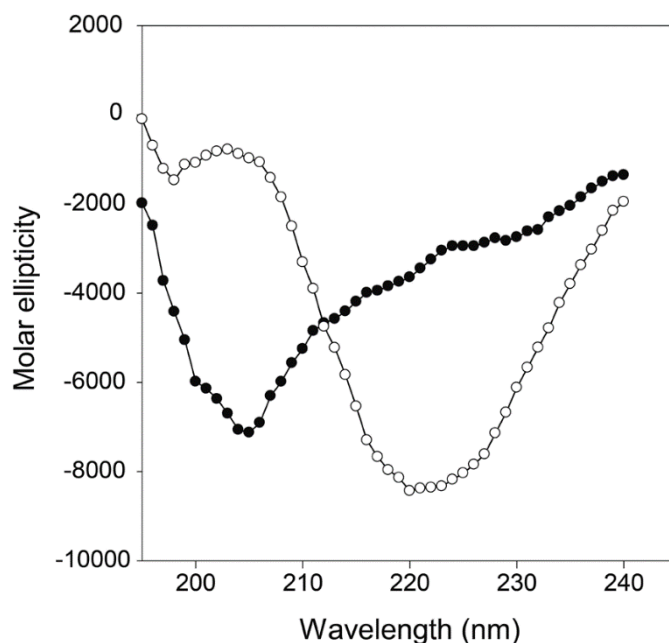


Figura 11. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano para la melitina monomérica (○) y tetramérica (●).

En la figura 12 se muestra el espectro de la melitina tetramérica una vez incorporada a las nanopartículas de PLGA y, como puede observarse, las nanopartículas solas no presentan un pico característico de estructura secundaria mientras que el espectro del sistema nano-melitina refleja una conformación alfa-helicoidal al presentar un pico negativo a 222nm. El contenido helicoidal de la melitina presente en las nanopartículas resultó de un 40%, similar a lo reportado para la melitina tetramérica a una concentración de péptido de 0.5mM (Huang *et al.*, 2013; Soman *et al.*, 2008) sugiriendo que la formación del tetrámero permanece estable después de la incorporación del péptido a la nanopartícula.

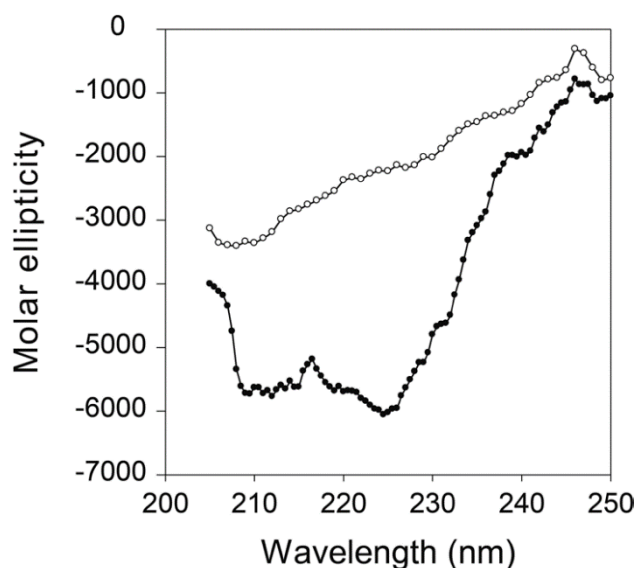


Figura 12. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano de la suspensión de nanopartículas de PLGA en ausencia (○) o presencia de melitina tetramérica (●).

Al realizar el seguimiento del Trp¹⁹ por espectroscopía de fluorescencia (Fig. 13) pudo observarse que el espectro de las nanopartículas cargadas con melitina presenta un desplazamiento hacia el azul, es decir un cambio en la intensidad de fluorescencia de 351nm a 331nm, si se compara con el espectro de la melitina en solución, estas diferencias en las propiedades de fluorescencia son indicativas de un cambio en el entorno de los residuos aromáticos, es decir que el residuo de Trp de la posición 19 se encuentra menos expuesto al agua cuando está en las nanopartículas que cuando se encuentra en la melitina monomérica confirmándose nuevamente la presencia del tetrámero de melitina en las nanopartículas.

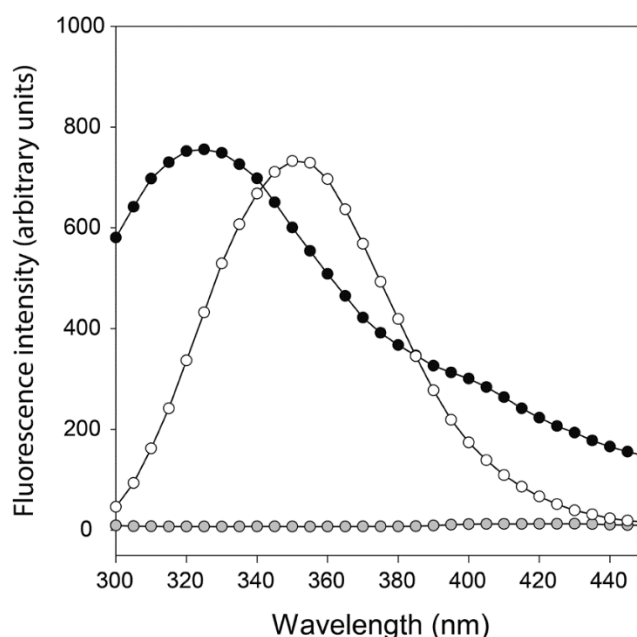


Figura 13. Espectros de emisión de fluorescencia de las nanopartículas de PLGA cargadas con melitina. Se muestran los espectros correspondientes a la emisión de fluorescencia intrínseca del residuo de triptófano de la melitina en solución (O), del sistema nano-melitina (●) y de las nanopartículas de PLGA (●). La longitud de onda de excitación fue de 280nm y la concentración de péptido de 20 µg/mL.

7.2 Preparación y caracterización fisicoquímica de las nanopartículas cargadas con melitina

La figura 14 muestra el tamaño promedio de las formulaciones de nanopartículas poliméricas biodegradables preparadas para la realización de este trabajo con y sin melitina. En la figura 14A puede observarse que el diámetro promedio obtenido para las nanopartículas oscila entre los $85\text{nm} \pm 20\text{nm}$ ($n=3$) con un índice de polidispersidad $\text{PDI} < 0.1$, lo que indica que la homogeneidad de tamaño es elevada y que se cuenta con un sistema mono-disperso típico. La adsorción de melitina en la superficie de las nanopartículas produjo un incremento en el tamaño de las mismas, con valores de diámetro promedio de $110 \pm 20\text{nm}$ ($n=3$) y un $\text{PDI} < 0.1$ (Fig 14B) originado probablemente por la interacción electrostática entre los residuos básicos presentes en la secuencia peptídica (I^{20} - K^{21} - R^{22} - K^{33} - R^{24} - Q^{25}) y el grupo polar del lutrol de las nanopartículas (Cui *et al.*, 2005).

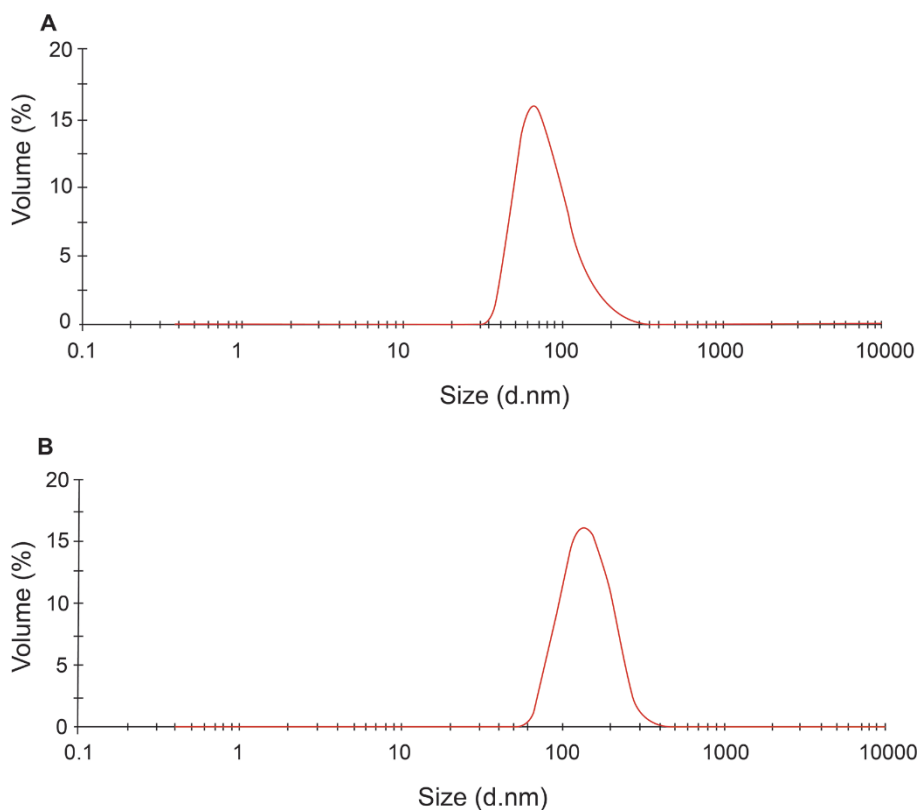


Figura 14. Tamaño promedio de las nanopartículas de PLGA en ausencia (A) y presencia de melitina (B)

7.3 Cuantificación de la melitina presente en las nanopartículas

La cuantificación de melitina encapsulada en las nanopartículas se realizó por un método indirecto en donde una vez incorporado el péptido a las nanopartículas, éstas se sometieron a centrifugación a 13,000rpm durante 3 horas para posteriormente evaluar la cantidad de péptido presente en el sobrenadante por espectroscopía de fluorescencia. Se realizó una recta patrón de melitina a partir de una solución madre a una concentración de 1mg/mL en buffer Hepes 50mM pH 7 conteniendo 150mM NaCl y se midió la intensidad de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 280nm. Los resultados se muestran en la figura 15.

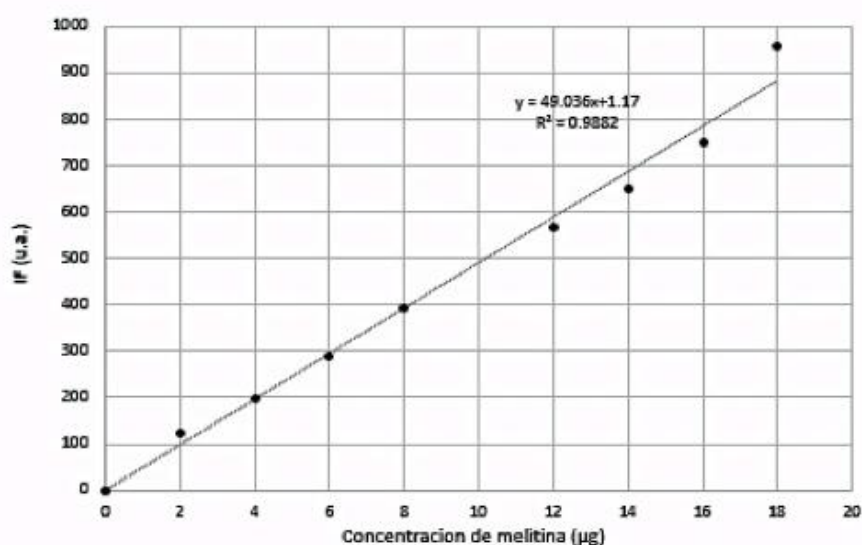


Figura 15. Curva de calibración de melitina elaborada a partir de una solución stock de melitina a [1mg/mL] en buffer Hepes 10mM pH 7.0 conteniendo NaCl 150mM.

Con el valor obtenido de melitina no unida, se determinó el porcentaje de eficiencia de encapsulación de péptido en las nanopartículas y se encontró que la suspensión preparada tuvo la capacidad de incorporar casi la totalidad de activo añadido, obteniendo un porcentaje de eficiencia del 85%. Se calculó la relación en masa de vehículo: activo y se encontró que por cada 40 mg de sólidos totales de la formulación (polímero y tensoactivo) es factible incorporar 170 μg de péptido. Estos valores concuerdan con lo reportado por

otros autores que han evaluado la capacidad de interacción entre partículas de PLGA y péptidos o proteínas y que han mostrado una alta interacción (Arroyo-Maya *et al.*, 2014).

7.6 Evaluación de la interacción y permeabilidad originada por el sistema nanomelitina con modelos de membrana

Para poder evaluar la capacidad lítica de las nanopartículas cargadas con melitina, se prepararon liposomas de distintas especies fosfolipídicas conteniendo ANTS como fluoróforo y DPX como quenchador. La Figura 16 muestra un ejemplo representativo de la purificación de estos liposomas y, como puede observarse, las sondas encapsuladas en vesículas fosfolipídicas (pico I) se separan fácilmente de las sondas libres (pico II) gracias a la gran diferencia de tamaño existente entre esas especies moleculares.

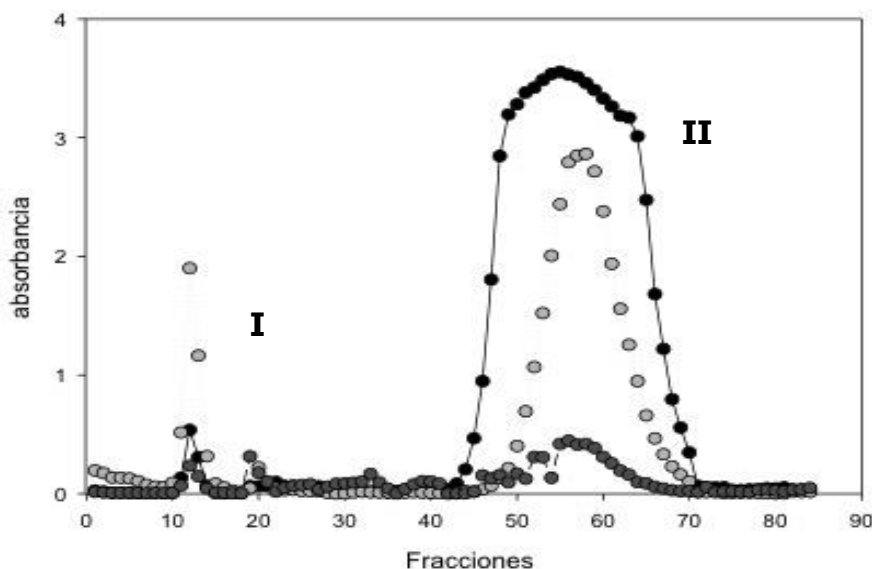


Figura 16. Cromatografía de exclusión molecular de la purificación de liposomas de PC/PE/PS/PA (50:25:15:10 p/p) encapsulando una solución 12.5mM ANTS, 45mM DPX. Las vesículas se prepararon por extrusión utilizando membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 100nm. El proceso de elución fue monitoreado a 259nm para el ANTS (círculos negros), 353nm DPX (círculos gris claro) y 400nm LUVs (círculos gris oscuro). El pico I corresponde a las sondas encapsuladas y el pico II a las no encapsuladas.

Una vez identificado el pico correspondiente a los liposomas que contienen el par ANTS/DPX, se colectaron esas fracciones y se realizó su cuantificación mediante el método de Rouser y colaboradores descrito en la metodología. Los fosfolípidos empleados

para la preparación de cada uno de los liposomas utilizados en este trabajo se basan en el estudio realizado por Dória y colaboradores (2013), sobre las alteraciones presentadas en el perfil fosfolipídico de células de epitelio mamario (MCF10A) y células de cáncer de mama (T-47D y MDA-MB-231) (Figura 17).

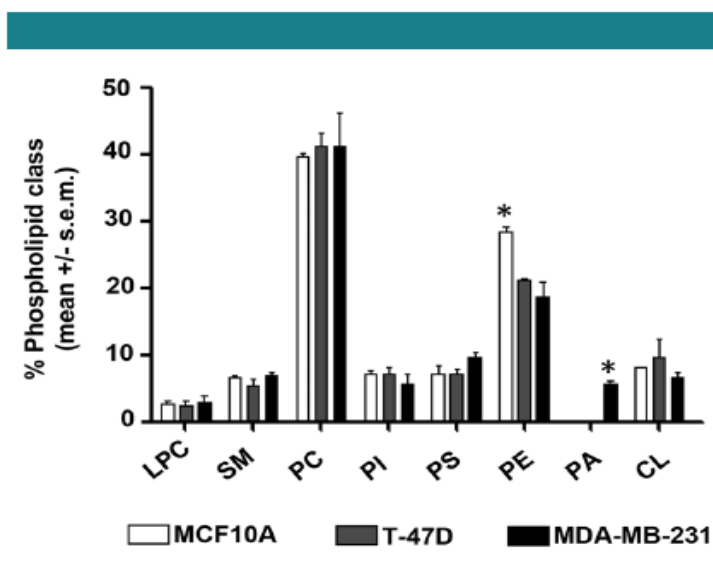


Figura 17. Abundancia relativa de fosfolípidos en células epiteliales mamarias humanas y líneas celulares de cáncer de mama. Tomado de Dória y colaboradores (2013).

Por lo que para simular las membranas de células de epitelio mamario sano se empleó la mezcla PC/PE/PS (50:40:10 p/p) y para semejar las membranas de las células de cáncer de mama se utilizó la mezcla PC/PE/PS/PA (50:25:15:10 p/p). Estos liposomas permiten tener un sistema modelo bien definido, permitiendo identificar las especies lipídicas y las propiedades de membrana que influyen la unión entre el sistema nanomelitina y los lípidos. Como lípido representativo de membranas celulares se emplearon liposomas compuestos en su totalidad por PC. La capacidad lítica del sistema nano-melitina se evaluó empleando el método de liberación de sondas, el cual consiste en medir el aumento en la intensidad de fluorescencia que resulta de la fuga y separación de la sonda (ANTS) y el apagador (DPX) que se encuentran en el interior de los liposomas. La propiedad de apagamiento de la fluorescencia permite que las fugas de los liposomas sean monitoreadas de manera continua siendo sensibles a pequeñas perturbaciones en la bicapa lipídica (Ralston et al., 1981). La Figura 18 muestra la capacidad lítica de la melitina sobre los liposomas que simulan las membranas celulares, la membrana de las células de epitelio

mamario y la membrana de las células de cáncer de mama. Inicialmente no se observa ninguna fluorescencia en todos los casos, debido que la elevada concentración de DPX (45 mM) apaga completamente la fluorescencia de la sonda (ANTS). Sin embargo, conforme se añaden a los liposomas las nanopartículas cargadas con melitina tetramérica, el par ANTS/DPX se libera de los liposomas debido a perturbaciones en su membrana llevando a una disminución en el efecto apagador del DPX incrementándose la fluorescencia del ANTS. El grado de incremento en la intensidad de fluorescencia es una medida del poder lítico del sistema nano-melitina en cada entorno lipídico probado. Es evidente que el poder lítico claramente depende de la composición de los liposomas, observándose un efecto ligeramente mayor en presencia de ácido fosfatídico (PA) (Fig 18A). Sin embargo, tanto para los liposomas que semejan las membranas del epitelio mamario cancerígeno como el sano (Figura 18B), el efecto lítico del sistema nano-melitina ocurre inmediatamente después de ser añadido sobre los liposomas, mientras que para los liposomas que semejan la membrana de los eritrocitos (Fig 18C) la cinética muestra que la actividad lítica lleva unos pocos segundos antes de que se alcance la máxima intensidad de fluorescencia.

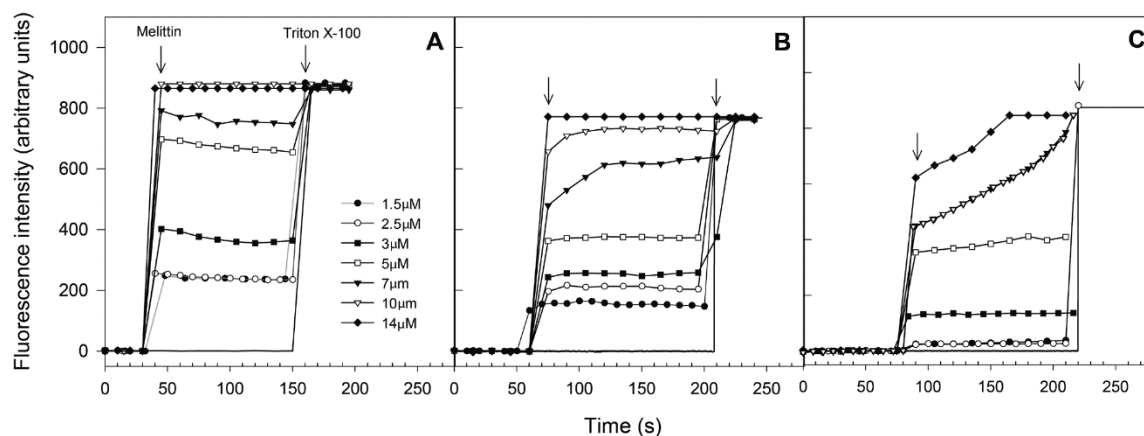


Figura 18. Cinéticas de liberación de contenidos acuosos desde liposomas de diferente composición. A) PC/PE/PS/PA (50:25:15:10 p/p), B) PC/PE/PS (50:40:10 p/p) y C) PC. La concentración final de lípido utilizada por ensayo fue de 75mM. La liberación se siguió monitorizando la emisión de fluorescencia del ANTS a 536nm utilizando una longitud de onda de excitación de 353nm.

En la figura 19 se resumen las propiedades líticas del sistema nano-melitina, en ella puede observarse que la incorporación de la melitina tetramérica en las nanopartículas de PLGA no altera la capacidad lítica de este péptido en ninguna de las composiciones lipídicas analizadas. El sistema nano-melitina fue capaz de permeabilizar el 50% de los liposomas de PC a una concentración entorno 2 mM, resultando más efectivo para inducir la perturbación de los liposomas que semejaban la membrana de células cancerosas y sanas, con una concentración de 1.2 mM y 1.8 mM respectivamente, indicando la importancia de las interacciones electrostáticas en este rompimiento.

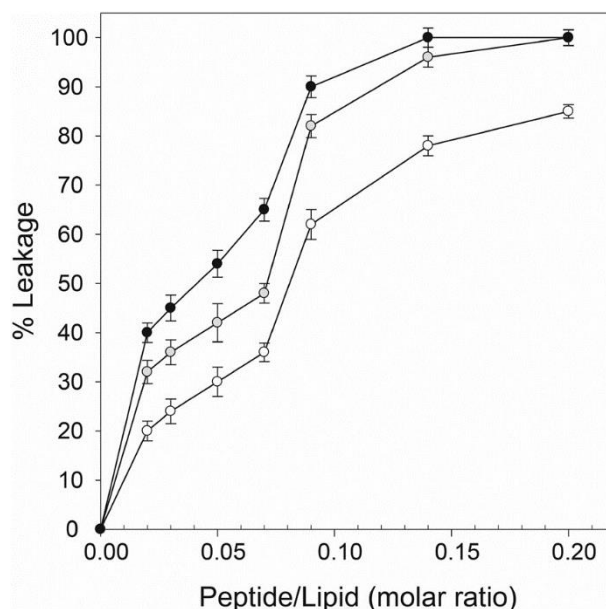


Figura 19. Efecto de la relación péptido/lípido en la liberación de contenidos acuosos desde vesículas de PC (O) PC/PE/PS (50:40:10 p/p) (●) y PC/PE/PS/PA (50:25:15:10 p/p) (●) originados por el sistema nano-melitina. La concentración de péptido probada fue de 0.6, 0.8, 1.2, 1.8, 2.4, 3.6 y 4.8 mM y la concentración final de lípido fue de 75mM. El porcentaje de liberación de contenidos se calculó considerando como el 100%, la fluorescencia resultante después de la adición de Triton X-100 (0.5% v/v) a los liposomas.

7.7. Caracterización de nanopartículas de PLGA cargadas con Avenantramida C

Para la caracterización de la formulación de nanopartículas biodegradables a base de PLGA usando como estabilizador (Pluronic F-68) se utilizó microscopia electrónica de barrido (SEM) y Dispersión dinámica de la luz DLS ($n = 3$). El tamaño de las nanopartículas solas (Control) fue de 130 ± 1 y el de nanopartículas encapsulando avenantramida -C fue de 160 ± 4 nm de diámetro según lo determinado por DLS (Figura. 20), el índice de polidispersidad de 0.186 y 0.170 respectivamente indicó una distribución de tamaño estrecha. En las imágenes SEM muestra una imagen con un voltaje de 0.5Kv. (Figura.21) en la cual las partículas muestran diámetros de aproximadamente 200nm. El DLS mide los radios hidrodinámicos dispersando partículas en fase acuosa o solventes, mientras que SEM mide el tamaño de las muestras secas teñidas con ácido tungstico depositadas sobre cinta de grafito. El tamaño de las nanopartículas, según lo observado por SEM, tuvo una buena correlación con el tamaño medido por DLS.

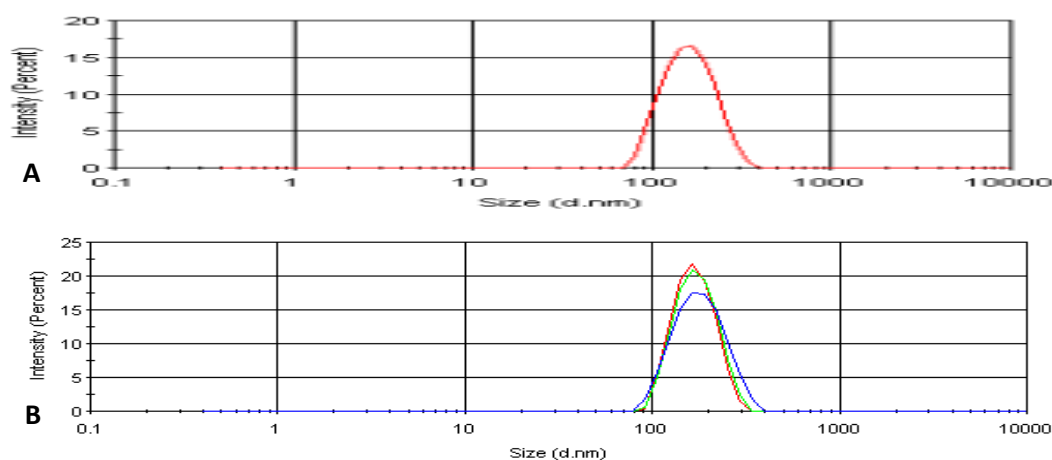


Figura 20. Tamaño promedio de las nanopartículas de PLGA A.) nanopartículas solas.

B.) nanopartículas encapsulando Avenantramida C.

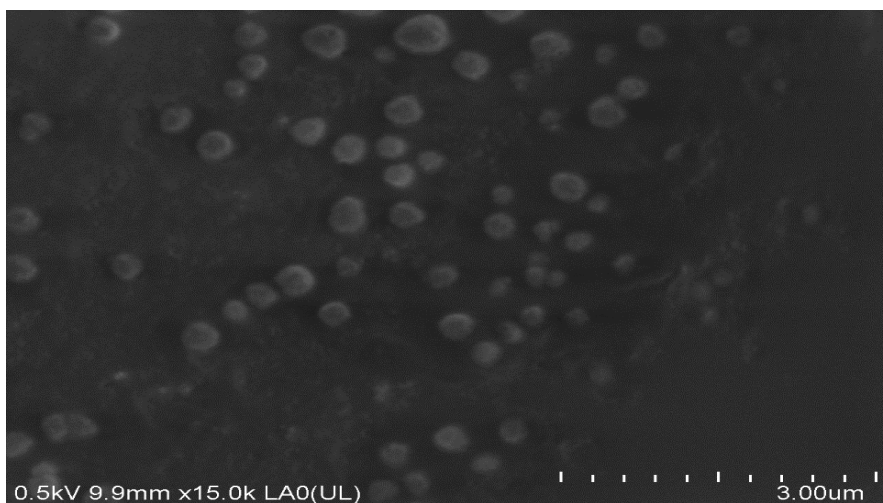


Figura 21. Imagen SEM de nanopartículas PLGA-Avenantramida C

7.7 Cuantificación de Avenantramida C en nanopartículas

La cuantificación de avenantramida encapsulada en las nanopartículas se realizó por un método indirecto en donde una vez realizadas las nanopartículas y agregados los 200 μ g de Avenantramida, éstas se sometieron a centrifugación a 12,000rpm durante 2 horas para posteriormente evaluar la cantidad de Avn -C presente en el sobrenadante por espectroscopía de fluorescencia. Se realizó una recta patrón de Avn -C (Figura 22) a partir de una solución madre a una concentración de 1mg/mL en metanol y se midió en una longitud de onda de 520 nm obteniendo un porcentaje de encapsulación de $55\pm3\%$ es decir 110 μ g de los 200 μ g totales.

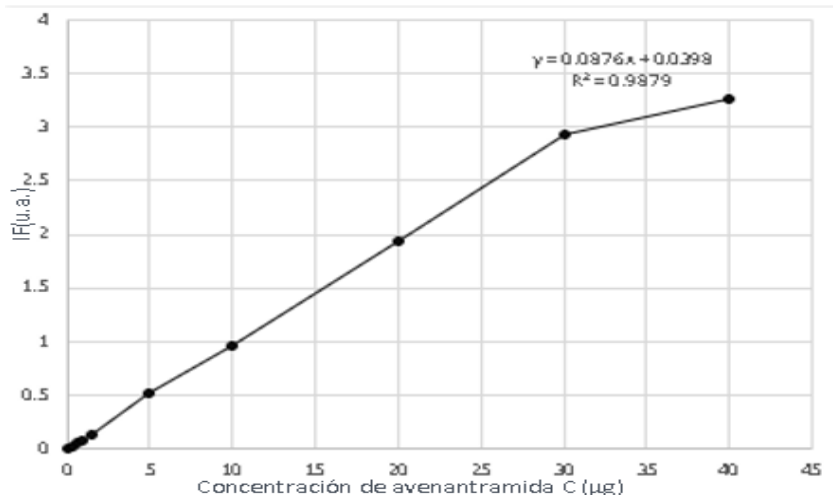


Figura 22. Curva de calibración de Avenantramida -C elaborada a partir de una solución stock de Avenantramida -C a [1mg/mL] en Metanol.

7.8 Cinética de liberación de la Avenantramida C

Los estudios de liberación in vitro se llevaron a cabo a partir de las nanopartículas constituidas por PLGA 75:25 que tienen incorporada Avn -C según la metodología descrita anteriormente en el apartado de materiales y métodos. En la Figura 23, se representa la liberación del polifenol durante 240h (10 días) desde las nanopartículas obtenidas por doble emulsión evaporación. Existe una liberación casi completa de la Avn-C desde estas nanopartículas. Al cabo de las 240 h, considerando que la encapsulación total fue de $(110 \pm 3 \mu\text{g})$ y la liberación al día 10 fue de $(95 \pm 6\mu\text{g})$, se libera un 86 % de Avn -C

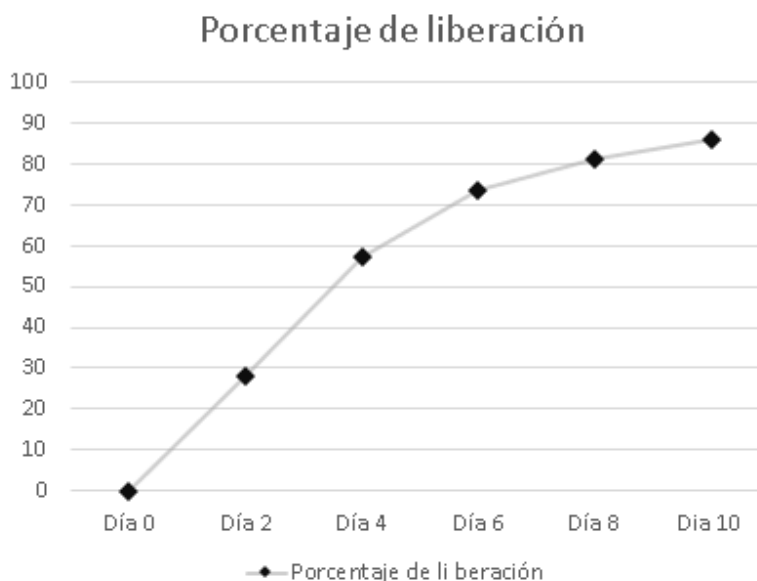


Figura 23.- Perfil de liberación in vitro de nanopartículas de PLGA

7.9 Ensayos in vitro de las nanopartículas con Avn -C en la línea celular MCF-7

Se probó la formulación liofilizada en la línea celular MCF-7 como se menciona en el apartado de materiales y métodos, no observando un efecto significativo sobre la misma.

8. DISCUSION

La melitina es un péptido anfipático catiónico de 26 aminoácidos que cuando se encuentra en solución adquiere una estructura aleatoria. Este péptido deriva del veneno de las abejas y tiene una variedad de propiedades farmacéuticas entre las que destacan efectos biológicos como antiviral, antibacteriano, antifúngico, antiparasitario y antitumoral. Se propuso que la melitina actúa como un compuesto citolítico no selectivo, es decir; el péptido interrumpe física y químicamente membranas celulares causando lisis celular por lo que fue considerado un candidato atractivo para la quimioterapia contra el cáncer. (Wu et al., 2018). La literatura actual disponible que involucra estudios *in vitro* e *in vivo* sugiere que la melitina afecta la transducción de señales y las vías reguladoras que conducen a múltiples mecanismos de muerte por cáncer, incluida la inhibición de la proliferación, la inducción de apoptosis, la inhibición de la angiogénesis, la detención del ciclo celular y la inhibición de la motilidad del cáncer, la migración, metástasis e invasión. (Rady et al; 2017). Sin embargo, la aplicación de melitina en el cáncer ha tenido un éxito limitado debido a varios problemas que incluyen toxicidad, baja especificidad, degradación, entrega sistémica ineficiente, biodisponibilidad limitada y principalmente alta hemólisis. Para sortear el problema con el uso del péptido para la terapia contra el cáncer, se han utilizado estrategias para mejorar estas desfavorables características estudiando la relación estructura-actividad con la finalidad de disminuir su actividad hemolítica utilizando estrategias como fusión o hibridación molecular, semisíntesis química, inserción o eliminación de aminoácidos y apoyándose en el uso de la nanotecnología como sistema de transporte. Las estrategias se enfocan principalmente en el segmento hidrofóbico N-terminal, residuos 1- 20, que confieren al péptido la capacidad de unión a membranas.

En esta investigación se utilizó la estrategia de favorecer un cambio estructural en el péptido y posteriormente incorporarlo en nanopartículas poliméricas. Dado que está bien descrito por Miura en 2015 que la concentración creciente de péptido o NaCl favorecen la formación del tetrámero de melitina y que la formación del tetrámero podría ayudar a disminuir la actividad hemolítica del péptido se decidió evaluar si esta estrategia resulta factible.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que bajo las condiciones experimentales empleadas se logra formar el tetrámero de melitina y que esta conformación estructural se mantiene incluso después de incorporarlo a las nanopartículas de PLGA presentando una estructura principalmente alfa-helicoidal (40%) aún en ausencia de moléculas lipídicas, lo que concuerda con lo reportado por otros autores (Huang *et al.*, 2013; Soman *et al.*, 2008). Por lo que se procedió a la evaluación de la capacidad citolítica del sistema nanomelitina.

Las vesículas lipídicas con diferentes estructuras se usan ampliamente en la administración de fármacos y en los sistemas combinados de quimioterapia y también se pueden usar para estudiar la formación de células artificiales, que imitan primitivamente la estructura basada en la membrana de las células eucariotas (Paleos *et al.* 2012). Las alteraciones de los perfiles de fosfolípidos se han asociado a enfermedades y hay lípidos específicos pueden estar involucrados en la aparición y evolución del cáncer (Bergelson *et al.*, 1968). Para este ensayo se diseñaron los liposomas utilizando la composición lipídica de (DORIA *et al.*, 2013) como se menciona en la sección de resultados para las membranas de células cancerígenas se observa la presencia del fosfolípido ácido fosfatídico (PA) que no se presenta en las células sanas ni en las células de eritrocitos así como un aumento en el fosfolípido fosfatidil etanolamina (PE), tomando en cuenta las diferencias en los perfiles lipídicos, se decidió la composición fosfolipídica que se utilizaría en los liposomas realizados. La disrupción de la membrana por el sistema nanomelitina se caracterizó usando un ensayo de liberación de contenidos acuosos como se describe en materiales y métodos. Los resultados obtenidos demuestran que la incorporación de melitina en las nanopartículas de PLGA no altera la capacidad citolítica de este péptido en ninguna de las vesículas de fosfolípidos analizadas (simulación del epitelio mamario sano, canceroso, eritrocitario). El sistema nanomelitina pudo irrumpir el 50% de los liposomas que simulan la membrana eritrocitaria (PC) a concentraciones de alrededor de 2mM. Observándose que el sistema fue más efectivo induciendo fugas en los liposomas que simulaban membranas de tejido mamario tanto sano (PC/PE/PS (50:40:10 p/p)) como cancerígeno (PC/PE/PS/PA (50:25:15:10 p/p)), aproximadamente 1.2 mM y 1.8 mM, respectivamente. Se ha informado que, en condiciones experimentales similares, la melitina libre origina fugas de los liposomas zwitteriónicos a alrededor de 0.25 mM y

a 0.4 mM de los liposomas que contienen 10% molar de fosfolípidos cargados negativamente (Higashino et al. 2001; Van den Bogaart et al. 2008; Soman et al. 2009) por lo tanto estos valores representan un aumento de aproximadamente del 8% en la concentración del péptido requerida para tener una perturbación en la membrana, comparada con nuestros resultados para liposomas zwitteriónicos (simulación de epitelio eritrocitario) y un aumento del 3% para liposomas que contienen PS (Simulación de epitelio mamario sano) y 5% de liposomas con PA (Simulación de epitelio mamario cancerígeno); es decir en los resultados de esta investigación se requiere una mayor concentración del péptido para causar disrupción en la simulación de membranas entonces es probable que la conformación tetramérica (modificación estructural) de la melitina incorporada en las nanopartículas de PLGA forma un parche hidrófobo cuando se estructura una región helicoidal, reduciendo la actividad lítica en los lípidos zwitteriónicos mientras que conserva su actividad citotóxica contra las membranas aniónicas. Estos resultados concuerdan con las observaciones hechas por Pandey y col. (2010), quienes reportan que lograron aumentar la selectividad celular realizando también una modificación estructural en el péptido usando una mutación Leu9Ala, la cual presentó una reducción significativa de la actividad hemolítica, al mismo tiempo que mostraba actividad antibacteriana contra las bacterias Grampositivas y negativas (Pandey et al. 2010).

Es importante tener en cuenta que la actividad lítica de nuestro sistema nanomelitina es más citotóxica que otros sistemas de nanopartículas de melitina reportados. Huang y col. (2013) diseñaron un péptido citolítico híbrido, α -melitina, en el que el extremo N terminal de melitina está unido al extremo C terminal de un péptido α -helicoidal anfipático a través de un conector GSG. Estas nanopartículas de melitina indujeron una liberación mínima de hemoglobina a una concentración de 50 mM mientras que la citotoxicidad en las células tumorales se alcanzó a 11,26 mM. Esto representa una tolerancia de aproximadamente 10 veces más que nuestro sistema para la simulación de membranas eritrocitarias y alrededor de 2 veces más para membranas que contienen fosfolípidos aniónicos tomando en cuenta la concentración máxima probada en este estudio (4.8mM). Soman y col. (2009) observaron una acción más protectora contra la hemólisis de glóbulos rojos con el uso de nanopartículas de perfluorocarbono recubierto con lípidos incorporando melitina; informan que incluso una concentración de nanopartículas de metiltina 25 mM solo

provocó 10% de hemólisis. Por lo tanto, está claro que para reducir la actividad hemolítica de melitina es necesario proteger su segmento N-terminal hidrófobo a través de cambios estructurales o alteración en la secuencia de melitina o mediante conjugación con otras moléculas hidrofóbicas. En este sentido, nuestros resultados demostraron que, es posible favorecer selectivamente la agregación de melitina y preservar la estructura tetramérica del péptido en forma activa una vez incorporada a las nanopartículas. Sin embargo, necesitamos mejorar nuestra formulación para reducir aún más la actividad lítica de melitina en las membranas modelo.

Además del desarrollo del sistema nanomelitina en este proyecto se contempló también una formulación de nanopartículas de PLGA para la encapsulación de Avenantramida C, las avenantramidas son un grupo de alcaloides fenólicos que se encuentran principalmente en la avena que poseen potentes propiedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* se ha descrito que tienen estructuras similares al fármaco antihistamínico sintético, conocido como tranilast, y según los estudios realizados, su actividad antioxidante es muchas veces mayor que otros antioxidantes como el ácido cafeico y la vainillina, las avenantramidas son relativamente estables a pH 4–6 y estas son más estables a la luz ultravioleta (UV) y al pH que los ácidos fenólicos (Tripathi et al., 2018). Entre todas las Avenantramidas, Avn-C tiene la propiedad antioxidante más alta, la máxima estabilidad al calor y está presente en concentraciones relativamente altas en la avena de hasta 300 ppm, además, se han encontrado en estas diferentes bioactividades, como antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa, sin embargo, estudios *in vivo* han destacado que Avn-C se absorbe poco en el tracto gastrointestinal y tiene una biodisponibilidad limitada (Pridal et al., 2018). Por este motivo, se ha ido investigando nuevas formulaciones con el fin de mejorarlo y continuar con el estudio en el polifenol, como se platicó anteriormente las ventajas que representa el uso de la nanotecnología en la encapsulación de activos naturales y debido a que es el futuro en la nanomedicina en este estudio, se han preparado nanopartículas con un polímero biodegradable (PLGA), reportado por la FDA como biocompatible y sobre todo no tóxico para el organismo vivo.

Para el desarrollo de estas nanopartículas se empleó como técnica de preparación doble emulsión evaporación tal como se ha descrito previamente en la sección de materiales y

métodos. La caracterización de la formulación se estudió en función de la forma y aspecto de las nanopartículas solas y cargadas con Avn -C. Las nanopartículas de PLGA mostraron un diámetro medio en el caso de las nanopartículas solas de 130 ± 1 nm y un PDI de 0.186 y de las nanopartículas con Avn -C 160 ± 4 nm y un PDI de 0.170 lo que indica sistemas monodispersos. Se han reportado resultados similares utilizando la misma técnica de encapsulación, observando un ligero aumento en el tamaño de la nanopartícula con Avn-C (Anwer et al., 2016), estos resultados pueden explicarse en función de que la encapsulación o atrapamiento de cualquier sustancia en el interior de las nanopartículas, puede generar un aumento en su tamaño debido al mayor número de interacciones en el interior de la misma (R. Huang & Lau, 2016) mientras que el PDI es mayor cuando las nanopartículas no tienen el polifenol esto puede ocurrir probablemente por la agregación entre las nanopartículas, se cree que al no estar presente el activo encapsulado y por el menor tamaño ocurre una agregación de partículas incrementando el PDI. En relación con la morfología de las nanopartículas, estas presentaron una morfología esférica, se calculó el diámetro promedio en 200 nm. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por (Jo et al., 2015). La diferencia entre los valores obtenidos por el DLS y por SEM puede deberse a la presencia de pequeñas cantidades de agregados de nanopartículas debido a que estas se llevaron a microscopio con adhesión a cinta de grafito y de forma seca (Bootz et al; 2004). Al considerar el uso de nanopartículas poliméricas para administración de activos, el tamaño de las partículas y la eficiencia de encapsulación son dos de las características más importantes de la formulación, en este proyecto se obtuvo una eficiencia de encapsulación de $55\% \pm 3$ debido a la ausencia de reportes de nanopartículas poliméricas con Avn-C no existe una referencia de comparación directa sin embargo se han reportado resultados similares para el resveratrol como antioxidante utilizando la misma técnica de encapsulación (Li et al., 2016). Siguiendo con la evaluación de la formulación realizada en este trabajo, se llevó a cabo el estudio de liberación *in vitro* pues es de vital importancia para conocer el porcentaje de principio activo liberado en función del tiempo y caracterizar la formulación desde un punto de vista cinético los resultados obtenidos muestran un total de 240 h en los cuales se logró la liberación de un 86% del activo encapsulado esto puede deberse a que la liberación del polifenol puede ser afectada por interacciones hidrófobas entre el polifenol y polímero y también debido

a que a mayor contenido de ácido láctico en el polímero, se crea un sistema más hidrófobo disminuyendo su hidrólisis y erosión, en este estudio se utilizó una relación 75:25 (ácido láctico /glicólico) por lo que posiblemente podría mejorarse la liberación si se disminuye el porcentaje de ácido láctico en el polímero utilizado, sin embargo resultados que difieren en un 10 % a los obtenidos en este estudio reportan (Yu et al; 2014) observando que existe una relación inversa entre la velocidad de liberación del principio activo y el tamaño de partícula, esta diferencia en los porcentajes se debe principalmente al tamaño de partícula ya que ellos reportan tamaños más grandes y se ha observado que el proceso de hidrólisis inicia tras el contacto con el medio acuoso formándose moléculas ácidas que catalizan la hidrólisis causando una degradación más rápida en el centro de la matriz que en la superficie de la partícula y esto se hace más acentuado en sistemas de mayor tamaño por lo que su liberación además de ser mayor se da en menor tiempo.

9. CONCLUSIONES

1. Es posible obtener de manera estable un tetrámero de melitina empleando una concentración de NaCl de 250 mM e incorporarlo a nanopartículas poliméricas mediante el método de doble emulsión con una eficiencia del 85%.
2. La incorporación del tetrámero de melitina en el sistema nanoparticulado solo logró disminuir la actividad hemolítica de este péptido en un 20%.
3. Se implementó un método de preparación de nanopartículas biodegradables de PLGA para la incorporación de Avenantramida-C, logrando una eficiencia de encapsulación del 55% y un tamaño promedio de nanopartículas de 160 nm.
4. Después de 10 días se logra liberar el 86% de la Avenantramida-C presente en el sistema nanoparticulado.

10. PERESPECTIVAS

1. Realizar modificaciones en el sistema nanomelitina de manera que permita disminuir en mayores porcentajes la hemolisis del péptido.
2. Obtener un mayor porcentaje de encapsulación de avenantramida C en las nanopartículas por medio de la modificación de los componentes de las mismas, así como el recubrimiento con polietilenglicol (PEG) para mejorar la entrega y liberación de esta.

11.-BIBLIOGRAFIA

- Aithal, P. S., & Aithal, S. (2016). A new model for commercialization of nanotechnology products & services. *International Journal of Computational Research and Development*, 1(1), 84–93.
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., & Farokhzad, O. C. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 505–515. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- Angelino, D., & Jeffery, E. (2014). Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin. *Journal of Functional Foods*, 7, 67–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.029>
- Anwer, M. K., Al-Mansoor, M. A., Jamil, S., Al-Shdefat, R., Ansari, M. N., & Shakeel, F. (2016). Development and evaluation of PLGA polymer based nanoparticles of quercetin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 213–219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.002>
- Auborn, K. J., Fan, S., Rosen, E. M., Goodwin, L., Chandraskaren, A., Williams, D. E., ... Carter, T. H. (2003). Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen. *The Journal of Nutrition*, 133(7 Suppl), 2470S–2475S.
- Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K., & Nagai, T. (1999). Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(4), 471–476. <https://doi.org/10.1081/ddc-100102197>
- Batra, P., & Sharma, A. K. (2013). *Anti-cancer potential of flavonoids : recent trends and future perspectives*. 439–459. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0117-5>
- Bei, C., Bindu, T., Remant, K. C., & Peisheng, X. (2015). Dual secured nano-melittin for the safe and effective eradication of cancer cells. *Journal of Materials Chemistry. B*, 3(1), 25—29. <https://doi.org/10.1039/C4TB01401D>
- Bell, J. (1978). *Thus , such a substitution w i l*. 38–41.
- Bello, J., Bello, H. R., & Granados, E. (1982). *Conformation and Aggregation of Melittin : Dependence on pH and Concentration +*. 461–465.

- Bender, A. R., von Briesen, H., Kreuter, J., Duncan, I. B., & Rubsamen-Waigmann, H. (1996). Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(6), 1467–1471.
- Bergelson, L. D., Dyatlovitskaya, E. V, Torkhovskaya, T. I., Sorokina, I. B., & Gorkova, N. P. (1968). Dedifferentiation of phospholipid composition in subcellular particles of cancer cells. *FEBS Letters*, 2(2), 87–90.
- Bhattacharya, A., Sood, P., & Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology*, 11(5), 705–719. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x>
- Binggeli, R., & Cameron, I. L. (1980). Cellular Potentials of Normal and Cancerous Fibroblasts and Hepatocytes. *Cancer Research*, 40(6), 1830 LP-1835. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/40/6/1830.abstract>
- Binggeli, R., & Weinstein, R. C. (1985). Deficits in Elevating Membrane Potential of Rat Fibrosarcoma Cells after Cell Contact. *Cancer Research*, 45(1), 235 LP-241. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/45/1/235.abstract>
- Bootz, A., Vogel, V., Schubert, D., & Kreuter, J. (2004). Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(2), 369–375. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00193-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00193-0)
- Carrasquillo, K. G., Stanley, A. M., Aponte-Carro, J. C., De Jesus, P., Costantino, H. R., Bosques, C. J., & Griebenow, K. (2001). Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 76(3), 199–208. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00430-8](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00430-8)
- Casagrande, R., Georgetti, S. R., Verri Jr, W. A., Jabor, J. R., Santos, A. C., & Fonseca, M. J. V. (2006). Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *AAPS PharmSciTech*, 7(1), E10–E10. <https://doi.org/10.1208/pt070110>
- Chen, C.-Y., Milbury, P. E., Kwak, H.-K., Collins, F. W., Samuel, P., & Blumberg, J. B. (2004).

- Avenanthramides and phenolic acids from oats are bioavailable and act synergistically with vitamin C to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *The Journal of Nutrition*, 134(6), 1459–1466. <https://doi.org/10.1093/jn/134.6.1459>
- Choi, M. J., McDonagh, A. M., Maynard, P., & Roux, C. (2008). Metal-containing nanoparticles and nano-structured particles in fingerprint detection. *Forensic Science International*, 179(2), 87–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.04.027>
- Collins, F. W. (1989). Oat phenolics: avenanthramides, novel substituted N-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(1), 60–66. <https://doi.org/10.1021/jf00085a015>
- Damge, C., Maincent, P., & Ubrich, N. (2007). Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 117(2), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.10.023>
- de Bruijn, W. J. C., van Dinteren, S., Gruppen, H., & Vincken, J.-P. (2019). Mass spectrometric characterisation of avenanthramides and enhancing their production by germination of oat (*Avena sativa*). *Food Chemistry*, 277, 682–690. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.013>
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Dempsey, C. E. (1990). The actions of melittin on membranes. *BBA - Reviews on Biomembranes*, 1031(2), 143–161. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(90\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0304-4157(90)90006-X)
- des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.-J., & Preat, V. (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 116(1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.08.013>
- Dominguez, G. A., Lohse, S. E., Torelli, M. D., Murphy, C. J., Hamers, R. J., Orr, G., & Klaper, R. D. (2015). Effects of charge and surface ligand properties of nanoparticles on oxidative stress and gene expression within the gut of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 162, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.015>

- Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., ... Nedović, V. (2015). Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 452–490. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>
- Duan, X., & Li, Y. (2013). Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. *Small*, 9(9–10), 1521–1532. <https://doi.org/10.1002/sml.201201390>
- Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., Santos, N. C., & Franco, O. L. (2017). Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Frontiers in Chemistry*, 5, 5. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00005>
- Garvin, S., Ollinger, K., & Dabrosin, C. (2006). Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Letters*, 231(1), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.01.031>
- Ginter, E. (2008). Vegetarian diets, chronic diseases and longevity. *Bratislavske Lekarske Listy*, 109(10), 463–466.
- Ginter, E., & Simko, V. (2015). *Recent data on Mediterranean diet , cardiovascular disease , cancer , diabetes and life expectancy*. 116(6), 346–348. <https://doi.org/10.4149/BLL>
- Golubnitschaja, O. (2007). *Cell cycle checkpoints : the role and evaluation for early diagnosis of senescence , cardiovascular , cancer , and neurodegenerative diseases Review Article*. 359–371. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0473-0>
- Gomez-Gaete, C., Tsapis, N., Besnard, M., Bochot, A., & Fattal, E. (2007). Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 331(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.028>
- Guo, W., Nie, L., Wu, D., Wise, M. L., Collins, F. W., Meydani, S. N., & Meydani, M. (2010). Avenanthramides inhibit proliferation of human colon cancer cell lines in vitro. *Nutrition and Cancer*, 62(8), 1007–1016. <https://doi.org/10.1080/01635581.2010.492090>
- Hait, W. N., Grais, L., Benz, C., & Cadman, E. C. (1985). *ancer hemotherapy and harmacology Inhibition of growth of leukemic cells by inhibitors of calmodulin : Phenothiazines and melittin I00 Mellitin*. 202–205.
- HAIT, W. N., & LEE, and G. L. (1988). Honeybee venom: A rich source of pharmacologically

- active peptides. *Endeavour*, 12(2), 60–65. [https://doi.org/10.1016/0160-9327\(88\)90082-8](https://doi.org/10.1016/0160-9327(88)90082-8)
- HAVAS, L. J. (1950). Effect of Bee Venom on Colchicine-induced Tumours. *Nature*, 166(4222), 567–568. <https://doi.org/10.1038/166567a0>
- Holle, L., Song, W., Holle, E., Wei, Y., Wagner, T., & Yu, X. (2015). *A matrix metalloproteinase 2 cleavable melittin / avidin conjugate specifically targets tumor cells in vitro and in vivo . A matrix metalloproteinase 2 cleavable melittin / avidin conjugate specifically targets tumor cells in vitro and in vivo*. (June). <https://doi.org/10.3892/ijo.22.1.93>
- Hu, H., Chen, D., Li, Y., & Zhang, X. (2006). Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/c nude mice in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(1), 83–89. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.1.0010>
- Huang, D., Liao, F., Molesa, S., Redinger, D., & Subramanian, V. (2003). Plastic-Compatible Low Resistance Printable Gold Nanoparticle Conductors for Flexible Electronics. *Journal of The Electrochemical Society*, 150(7), G412–G417. <https://doi.org/10.1149/1.1582466>
- Huang, R., & Lau, B. L. T. (2016). Biomolecule–nanoparticle interactions: Elucidation of the thermodynamics by isothermal titration calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(5), 945–956. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.01.027>
- Hui, L., Leung, K., & Chen, H. M. (2002). The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells. *Anticancer Research*, 22(5), 2811–2816. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/12530001>
- Jahanshahi, M., & Babaei, Z. (2008). Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 7. <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i25.59701>
- Jo, D. H., Kim, J. H., Lee, T. G., & Kim, J. H. (2015). Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(7), 1603–1611. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.04.015>
- Jørgensen, K., Davidsen, J., Andresen, T. L., & Mouritsen, O. G. (2004, February 17). Rational

Design of a Liposomal Drug Delivery System Based on Biophysical Studies of Phospholipase A2 Activity on Model Lipid Membranes. *Lipases and Phospholipases in Drug Development*, pp. 41–54. <https://doi.org/doi:10.1002/3527601910.ch3>

- Kahraman, E., Güngör, S., & Ozsoy, Y. (2017). Potential enhancement and targeting strategies of polymeric and lipid-based nanocarriers in dermal drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 8, 967–985. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0075>
- Kang, C., Shin, W. S., Yeo, D., Lim, W., Zhang, T., & Ji, L. L. (2018). Anti-inflammatory effect of avenanthramides via NF- κ B pathways in C2C12 skeletal muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 117, 30–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.020>
- Kapinova, A., Kubatka, P., Golubnitschaja, O., Kello, M., Zubor, P., Solar, P., & Pec, M. (2018). Dietary phytochemicals in breast cancer research: anticancer effects and potential utility for effective chemoprevention. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 23(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12199-018-0724-1>
- Katz, D. L., Nawaz, H., Boukhalil, J., Chan, W., Ahmadi, R., Giannamore, V., & Sarrel, P. M. (2001). Effects of oat and wheat cereals on endothelial responses. *Preventive Medicine*, 33(5), 476–484. <https://doi.org/10.1006/pmed.2001.0918>
- Killion, J. J., & Dunn, J. D. (1986). Differential cytolysis of murine spleen, bone-marrow and leukemia cells by melittin reveals differences in membrane topography. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 139(1), 222–227. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(86\)80102-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-291X(86)80102-4)
- Kizilkaya, B., Cevik, N., & Turker, G. (2013). The Phenolic Compounds in Berries: Beneficial Effects on Human Health. *New Knowledge Journal of Science*, 52–55. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9041-7>
- Knöppel, E., Eisenberg, D., & Wickner, W. (1979). Interactions of Melittin, a Preprotein Model, with Detergents. *Biochemistry*, 18(19), 4177–4181. <https://doi.org/10.1021/bi00586a021>
- Koenig, R. T., Dickman, J. R., Wise, M. L., & Ji, L. L. (2011). Avenanthramides are bioavailable and accumulate in hepatic, cardiac, and skeletal muscle tissue following oral gavage in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6438–6443. <https://doi.org/10.1021/jf2002427>

- Koenig, R. T., & Parkin, K. (2012). *AVENANTHRAMIDE SUPPLEMENTATION IN YOUNG AND OLDER WOMEN: PROTECTION AGAINST ECCENTRIC EXERCISE-INDUCED INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS*.
- Kostarelos, K. (2010, April). Nanorobots for medicine: how close are we? *Nanomedicine (London, England)*, Vol. 5, pp. 341–342. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.19>
- Kreuter, J. (2015). Influence of chronobiology on the nanoparticle-mediated drug uptake into the brain. *Pharmaceutics*, 7(1), 3–9. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7010003>
- Langer, K., Coester, C., Weber, C., von Briesen, H., & Kreuter, J. (2000). Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 49(3), 303–307.
- Lazo, J. S., Hait, W. N., Kennedy, K. A., Braun, I. D., & Meandzija, B. (1985). Enhanced bleomycin-induced DNA damage and cytotoxicity with calmodulin antagonists. *Molecular Pharmacology*, 27(3), 387 LP-393. Retrieved from <http://molpharm.aspetjournals.org/content/27/3/387.abstract>
- Lee, K. S., Chung, H. C., Im, S. A., Park, Y. H., Kim, C. S., Kim, S.-B., ... Ro, J. (2008). Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 108(2), 241–250. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9591-y>
- Lee, Y. J., Kang, S. J., Kim, B. M., & Kim, Y. J. (2007). *Cytotoxicity of honeybee (Apis mellifera) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells*. 169, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.06.036>
- Li, J., Zhao, L., Huang, X., Liu, L., Zhang, Z., Chen, Y., ... Gong, L. (2016). Polyethyleneglycol-modified poly(d,l-lactide-co-glycolide) loaded resveratrol nanoparticles characterization and their anti-cancer activities. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(9), 9477–9481. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12368>
- Liao, C., Esai Selvan, M., Zhao, J., Slimovitch, J. L., Schneebeli, S. T., Shelley, M., ... Li, J. (2015). Melittin Aggregation in Aqueous Solutions: Insight from Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(33), 10390–10398. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.5b03254>

- Liu, L., Zubik, L., Collins, F. W., Marko, M., & Meydani, M. (2004). The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds. *Atherosclerosis*, 175(1), 39–49.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.01.044>
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12 Suppl), 3479S–3485S.
<https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479S>
- Liu, T. M., Musinski, L. D., Patel, P. R., Gallimore, A. D., Gilchrist, B. E., & Keidar, M. (2007). Nanoparticle Electric Propulsion for Space Exploration. *AIP Conference Proceedings*, 880(1), 787–794. <https://doi.org/10.1063/1.2437518>
- Lizárraga-velázquez, C. E., Hernández, C., & González-aguilar, G. A. (2018). *Propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes de polifenoles en peces carnívoros de cultivo* *Antioxidant and immunostimulant properties of polyphenols in carnivorous farmed fish*. (March). <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v12i2.904>
- Lovisol, D., Dionisi, M., A. Ruffinatti, F., & Distasi, C. (2018). Nanoparticles and potential neurotoxicity: focus on molecular mechanisms. *AIMS Molecular Science*, 5(1), 1–13.
<https://doi.org/10.3934/molsci.2018.1.1>
- Ma, H., Lai, F., Xie, H., Wang, J., & Wang, H. (2008). Involvement of the Bcl-2 family members in Pinus massoniana bark extract induced apoptosis in HeLa cells. *Phytotherapy Research : PTR*, 22(11), 1472–1476. <https://doi.org/10.1002/ptr.2496>
- Marmouzi, I., & Ezzat, S. M. (2018). Chapter 1 - The Pharmacology of Avenanthramides: Polyphenols. In R. R. Watson, V. R. Preedy, & S. Zibadi (Eds.), *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease (Second Edition)* (Second Edi, pp. 3–13).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813008-7.00001-1>
- Mccarthy, D., Malhotra, M., O'Mahony, A., Cryan, J., & O'Driscoll, C. (2014). Nanoparticles and the Blood-Brain Barrier: Advancing from In-Vitro Models Towards Therapeutic Significance. *Pharmaceutical Research*, 32. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1545-6>
- Meng, Q., Yuan, F., Goldberg, I. D., Rosen, E. M., Auborn, K., & Fan, S. (2000). Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen receptor-alpha signaling in human tumor cells. *The Journal of Nutrition*, 130(12), 2927–2931. <https://doi.org/10.1093/jn/130.12.2927>
- Meydani, M. (2009). Potential health benefits of avenanthramides of oats. *Nutrition Reviews*,

67(12), 731–735. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00256.x>

Miura, Y. (2015). *NMR chemical shift analysis of the conformational transition between the monomer and tetramer of melittin in an aqueous solution*. <https://doi.org/10.1007/s00249-015-1102-1>

Moon, D.-O., Park, S.-Y., Heo, M.-S., Kim, K.-C., Park, C., Ko, W. S., ... Kim, G.-Y. (2006). Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *International Immunopharmacology*, 6(12), 1796–1807. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.07.027>

Mu, L., & Feng, S. S. (2003). A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 86(1), 33–48. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00320-6](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00320-6)

MUFSON, R. A., LASKIN, J. D., FISHER, P. B., & WEINSTEIN, I. B. (1979). Melittin shares certain cellular effects with phorbol ester tumour promoters. *Nature*, 280(5717), 72–74. <https://doi.org/10.1038/280072a0>

Multari, S., Pihlava, J.-M., Ollennu-Chuasam, P., Hietaniemi, V., Yang, B., & Suomela, J.-P. (2018). Identification and Quantification of Avenanthramides and Free and Bound Phenolic Acids in Eight Cultivars of Husked Oat (*Avena sativa* L) from Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(11), 2900–2908. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05726>

Nagpal, K., Singh, S., & Mishra, D. (2010). Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 58, 1423–1430. <https://doi.org/10.1248/cpb.58.1423>

Nazareno, E. S., Li, F., Smith, M., Park, R. F., Kianian, S. F., & Figueroa, M. (2018). Puccinia coronata f. sp. avenae: a threat to global oat production. *Molecular Plant Pathology*, 19(5), 1047–1060. <https://doi.org/10.1111/mpp.12608>

Nie, L., Wise, M. L., Peterson, D. M., & Meydani, M. (2006). Avenanthramide, a polyphenol from oats, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and enhances nitric oxide production. *Atherosclerosis*, 186(2), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.07.027>

- Oldfield ML. (1998). The value of conserving genetic resources. *Sinauer Associates, Inc.*, 1, 379.
- Oren, Z., & Shai, Y. (1997). Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: Structure-function study. *Biochemistry*, 36(7), 1826–1835. <https://doi.org/10.1021/bi962507l>
- Oršolić, N. (2012). Bee venom in cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(1–2), 173–194. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9339-3>
- Ota, N., Takano, F., Muroga, S., Kawabata, T., Ishigaki, Y., Yahagi, N., & Ohta, T. (2012). Garlic extract and its selected organosulphur constituents promote ileal immune responses ex vivo. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 243–252. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.11.003>
- Othman, S. H. (2014). Bio-nanocomposite Materials for Food Packaging Applications: Types of Biopolymer and Nano-sized Filler. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 296–303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.042>
- Pak, S. C. (2016). An Introduction to the Toxins Special Issue on “Bee and Wasp Venoms: Biological Characteristics and Therapeutic Application.” *Toxins*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/toxins8110315>
- Pan, H., Soman, N. R., Schlesinger, P. H., Lanza, G. M., & Wickline, S. A. (2011). *Cytolytic peptide nanoparticles (‘ NanoBees ’) for cancer therapy*. <https://doi.org/10.1002/wnan.126>
- Panyam, J., & Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(3), 329–347.
- Pedras, M. S., Jha, M., & Ahiahonu, P. (2003). The Synthesis and Biosynthesis of Phytoalexins Produced by Cruciferous Plants. *Current Organic Chemistry*, 7, 1635–1647. <https://doi.org/10.2174/1385272033486242>
- Perelshtein, I., Applerot, G., Perkash, N., Guibert, G., Mikhailov, S., & Gedanken, A. (2008). Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity. *Nanotechnology*, 19(24), 245705. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/24/245705>
- Perrelli, A., Goitre, L., Salzano, A. M., Moglia, A., Scaloni, A., & Retta, S. F. (2018). *Review Article Biological Activities , Health Benefits , and Therapeutic Properties of*

Avenanthramides : From Skin Protection to Prevention and Treatment of Cerebrovascular Diseases. 2018(Ldl).

- Peterson, D. M., Hahn, M. J., & Emmons, C. L. (2002). Oat avenanthramides exhibit antioxidant activities in vitro. *Food Chemistry*, 79(4), 473–478.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00219-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00219-4)
- Pino-Angeles, A., & Lazaridis, T. (2018). Effects of Peptide Charge, Orientation, and Concentration on Melittin Transmembrane Pores. *Biophysical Journal*, 114(12), 2865–2874. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.05.006>
- Pridal, A. A., Böttger, W., & Ross, A. B. (2018). Analysis of avenanthramides in oat products and estimation of avenanthramide intake in humans. *Food Chemistry*, 253, 93–100.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.138>
- Rady, I., Siddiqui, I. A., Rady, M., & Mukhtar, H. (2017). Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters*, 402, 16–31.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.010>
- Raghuvanshi, R. S., Katare, Y. K., Lalwani, K., Ali, M. M., Singh, O., & Panda, A. K. (2002). Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *International Journal of Pharmaceutics*, 245(1–2), 109–121. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00342-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00342-3)
- Rasane, P., Jha, A., & Sabikhi, L. (2013). *Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review*. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1072-1>
- Rasane, P., Jha, A., Sabikhi, L., Kumar, A., & Unnikrishnan, V. S. (2015). Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 662—675.
<https://doi.org/10.1007/s13197-013-1072-1>
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>
- Sahana, D. K., Mittal, G., Bhardwaj, V., & Kumar, M. N. V. R. (2008). PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug. *Journal of*

- Pharmaceutical Sciences*, 97(4), 1530–1542. <https://doi.org/10.1002/jps.21158>
- Salamanca-Buentello, F., Persad, D. L., Court, E. B., Martin, D. K., Daar, A. S., & Singer, P. A. (2005). Nanotechnology and the developing world. *PLoS Medicine*, 2(5), e97–e97. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020097>
- Saltzman, E., Das, S. K., Lichtenstein, A. H., Dallal, G. E., Corrales, A., Schaefer, E. J., ... Roberts, S. B. (2001). An oat-containing hypocaloric diet reduces systolic blood pressure and improves lipid profile beyond effects of weight loss in men and women. *The Journal of Nutrition*, 131(5), 1465–1470. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1465>
- Salvatore, E., Elena, S., Francesco, A., & Michele, P. (2017). Antiproliferative activity of vitexin-2- O -xyloside and avenanthramides on CaCo-2 and HepG2 cancer cells occurs through apoptosis induction and reduction of pro-survival mechanisms. *European Journal of Nutrition*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1418-y>
- Schroeder, U., Sommerfeld, P., Ulrich, S., & Sabel, B. A. (1998). Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(11), 1305–1307. <https://doi.org/10.1021/js980084y>
- Shenoy, D. B., & Amiji, M. M. (2005). Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 293(1–2), 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.12.010>
- Shinde, N. C., Keshkar, N. J., & Argade, P. D. (2012). Nanoparticles: Advances in drug delivery systems. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3, 922–929.
- Singh, S. V., & Singh, K. (2012). Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. *Carcinogenesis*, 33(10), 1833–1842. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs216>
- Soman, N. R., Baldwin, S. L., Hu, G., Marsh, J. N., Lanza, G. M., Heuser, J. E., ... Schlesinger, P. H. (2009). Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2830–2842. <https://doi.org/10.1172/JCI38842>
- Soman, N. R., Lanza, G. M., Heuser, J. M., Schlesinger, P. H., & Wickline, S. A. (2008).

- Synthesis and characterization of stable fluorocarbon nanostructures as drug delivery vehicles for cytolytic peptides. *Nano Letters*, 8(4), 1131–1136.
<https://doi.org/10.1021/nl073290r>
- Son, D. J., Lee, J. W., Lee, Y. H., Song, H. S., Lee, C. K., & Hong, J. T. (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology and Therapeutics*, 115(2), 246–270.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.004>
- Srivastava, R. M., Srivastava, S., Singh, M., Bajpai, V. K., & Ghosh, J. K. (2012). Consequences of alteration in leucine zipper sequence of melittin in its neutralization of lipopolysaccharide-induced proinflammatory response in macrophage cells and interaction with lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1980–1995.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302893>
- Stankowski, S., Pawlak, M., Kaisheva, E., Robert, C. H., & Schwarz, G. (1991). A combined study of aggregation, membrane affinity and pore activity of natural and modified melittin. *BBA - Biomembranes*, 1069(1), 77–86. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90106-I](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90106-I)
- Stark, W. J., Stoessel, P. R., Wohlleben, W., & Hafner, A. (2015). Industrial applications of nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 44(16), 5793–5805.
<https://doi.org/10.1039/c4cs00362d>
- Sur, R., Nigam, A., Grote, D., Liebel, F., & Southall, M. D. (2008). Avenanthramides, polyphenols from oats, exhibit anti-inflammatory and anti-itch activity. *Archives of Dermatological Research*, 300(10), 569–574. <https://doi.org/10.1007/s00403-008-0858-x>
- Takaichi, S. (2011). Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9(6), 1101–1118. <https://doi.org/10.3390/md9061101>
- Tanaka, T., Shnimizu, M., & Moriwaki, H. (2012). Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(3), 3202–3242.
<https://doi.org/10.3390/molecules17033202>
- Terwilliger, T. C., Weissman, L., & Eisenberg, D. (1982). The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities. *Biophysical Journal*, 37(1), 353–361. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(82\)84683-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(82)84683-3)
- Tiyaboonchai, W. (2003). Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery.

- Tripathi, V., Mohd, A. S., & Ashraf, T. (2018). Avenanthramides of Oats: Medicinal Importance and Future Perspectives. *Pharmacognosy Reviews*, 12(23).
- Utkin, Y. N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(2), 28. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i2.28>
- van Vlerken, L. E., Vyas, T. K., & Amiji, M. M. (2007). Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharmaceutical Research*, 24(8), 1405–1414. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9284-6>
- Varenne, F., Makky, A., Gaucher-Delmas, M., Violleau, F., & Vauthier, C. (2016). Multimodal Dispersion of Nanoparticles: A Comprehensive Evaluation of Size Distribution with 9 Size Measurement Methods. *Pharmaceutical Research*, 33(5), 1220–1234. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1867-7>
- Ventola, C. L. (2017). Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 42(12), 742–755.
- Walsh, E. G., Maher, S., Devocelle, M., O'Brien, P. J., Baird, A. W., & Brayden, D. J. (2011). High content analysis to determine cytotoxicity of the antimicrobial peptide, melittin and selected structural analogs. *Peptides*, 32(8), 1764–1773. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.06.006>
- Walters, M., Ribeiro, A. P. L., Hosseinian, F., & Tsopmo, A. (2018). Phenolic acids, avenanthramides, and antioxidant activity of oats defatted with hexane or supercritical fluid. *Journal of Cereal Science*, 79, 21–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.09.010>
- Wang, C., & Eskiw, C. H. (2019). Cytoprotective effects of Avenanthramide C against oxidative and inflammatory stress in normal human dermal fibroblasts. *Scientific Reports*, 9(1), 2932. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39244-9>
- Wang, P., Chen, H., Zhu, Y., McBride, J., Fu, J., & Sang, S. (2015). Oat Avenanthramide-C (2c) Is Biotransformed by Mice and the Human Microbiota into Bioactive Metabolites. *The Journal of Nutrition*, 145, 239–245. <https://doi.org/10.3945/jn.114.206508>
- Wen-Ru Li, Xiao-Bao Xie, Qing-Shan Shi, Shun-Shan Duan, You-Sheng Ouyang Chen, Y.-B. (2015). Antibacterial effect of silver nanoparticles on talc composites. *Research on*

- Chemical Intermediates*, 41(1), 251–263. <https://doi.org/10.1007/s11164-013-1188-y>
- Wu, Q., Patocka, J., & Kuca, K. (2018). Insect Antimicrobial Peptides, a Mini Review. *Toxins*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/toxins10110461>
- Xu, Q., Ensign, L. M., Boylan, N. J., Schön, A., Gong, X., Yang, J.-C., ... Hanes, J. (2015). Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus ex Vivo and Distribution in Vivo. *ACS Nano*, 9(9), 9217–9227. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b03876>
- Yadav, N., Khatak, S., & Sara, U. V. (2013). Solid lipid nanoparticles- A review. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 5, 8–18.
- Yamakawa, M. (1998). Insect antibacterial proteins : Regulatory mechanisms of their synthesis and a possibility as new antibiotics . Laboratory of Biological Defense , Department of Insect Physiology and Behavior , National Institute of Sericultural and Ento. *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 67, 163–168.
- Yang, K., & Ma, Y. Q. (2010). Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nature Nanotechnology*, 5(8), 579–583. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.141>
- Yang, R.-S., Tang, C.-H., Chuang, W.-J., Huang, T.-H., Peng, H.-C., Huang, T.-F., & Fu, W.-M. (2005). Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. *Toxicon*, 45(5), 661–669. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.01.013>
- Yu, Z., Yu, M., Zhang, Z., Hong, G., & Xiong, Q. (2014). Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 343. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-343>
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., & Vigneron, C. (1999). Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 60(2–3), 179–188. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(99\)00073-5](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00073-5)
- Zhang, S., Liu, Y., Ye, Y., Wang, X.-R., Lin, L.-T., Xiao, L.-Y., ... Liu, C.-Z. (2018). Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. *Toxicon*, 148, 64–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.012>
- Zhang, W., Chen, H., Liu, D.-L., Li, H., Luo, J., Zhang, J.-H., ... Lin, S.-Z. (2013). Emodin

- sensitizes the gemcitabine-resistant cell line Bxpc-3/Gem to gemcitabine via downregulation of NF-kappaB and its regulated targets. *International Journal of Oncology*, 42(4), 1189–1196. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1839>
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D., Li, S., Chen, Y., & Li, H. (2016). *Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer*. <https://doi.org/10.3390/nu8080515>
- Zhu, H. G., Tayeh, I., Israel, L., & Castagna, M. (1991). Different susceptibility of lung cell lines to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 5(2), 52—58. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/1910248>
- Aithal, P. S., & Aithal, S. (2016). A new model for commercialization of nanotechnology products & services. *International Journal of Computational Research and Development*, 1(1), 84–93.
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., & Farokhzad, O. C. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 505–515. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- Angelino, D., & Jeffery, E. (2014). Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin. *Journal of Functional Foods*, 7, 67–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.029>
- Anwer, M. K., Al-Mansoor, M. A., Jamil, S., Al-Shdefat, R., Ansari, M. N., & Shakeel, F. (2016). Development and evaluation of PLGA polymer based nanoparticles of quercetin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 213–219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.002>
- Auborn, K. J., Fan, S., Rosen, E. M., Goodwin, L., Chandraskaren, A., Williams, D. E., ... Carter, T. H. (2003). Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen. *The Journal of Nutrition*, 133(7 Suppl), 2470S–2475S.
- Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K., & Nagai, T. (1999). Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(4), 471–476. <https://doi.org/10.1081/ddc-100102197>
- Batra, P., & Sharma, A. K. (2013). *Anti-cancer potential of flavonoids : recent trends and future perspectives*. 439–459. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0117-5>
- Bei, C., Bindu, T., Remant, K. C., & Peisheng, X. (2015). Dual secured nano-melittin for the safe and effective eradication of cancer cells. *Journal of Materials Chemistry. B*, 3(1), 25—29.

<https://doi.org/10.1039/C4TB01401D>

Bell, J. (1978). *Thus, such a substitution will*. 38–41.

Bello, J., Bello, H. R., & Granados, E. (1982). *Conformation and Aggregation of Melittin : Dependence on pH and Concentration*. 461–465.

Bender, A. R., von Briesen, H., Kreuter, J., Duncan, I. B., & Rubsamen-Waigmann, H. (1996). Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(6), 1467–1471.

Bergelson, L. D., Dyatlovitskaya, E. V., Torkhovskaya, T. I., Sorokina, I. B., & Gorkova, N. P. (1968). Dedifferentiation of phospholipid composition in subcellular particles of cancer cells. *FEBS Letters*, 2(2), 87–90.

Bhattacharya, A., Sood, P., & Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology*, 11(5), 705–719. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x>

Binggeli, R., & Cameron, I. L. (1980). Cellular Potentials of Normal and Cancerous Fibroblasts and Hepatocytes. *Cancer Research*, 40(6), 1830 LP-1835. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/40/6/1830.abstract>

Binggeli, R., & Weinstein, R. C. (1985). Deficits in Elevating Membrane Potential of Rat Fibrosarcoma Cells after Cell Contact. *Cancer Research*, 45(1), 235 LP-241. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/45/1/235.abstract>

Bootz, A., Vogel, V., Schubert, D., & Kreuter, J. (2004). Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(2), 369–375. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00193-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00193-0)

Carrasquillo, K. G., Stanley, A. M., Aponte-Carro, J. C., De Jesus, P., Costantino, H. R., Bosques, C. J., & Griebenow, K. (2001). Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 76(3), 199–208. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00430-8](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00430-8)

Casagrande, R., Georgetti, S. R., Verri Jr, W. A., Jabor, J. R., Santos, A. C., & Fonseca, M. J. V. (2006). Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *AAPS PharmSciTech*, 7(1), E10–E10. <https://doi.org/10.1208/pt070110>

- Chen, C.-Y., Milbury, P. E., Kwak, H.-K., Collins, F. W., Samuel, P., & Blumberg, J. B. (2004). Avenanthramides and phenolic acids from oats are bioavailable and act synergistically with vitamin C to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *The Journal of Nutrition*, 134(6), 1459–1466. <https://doi.org/10.1093/jn/134.6.1459>
- Choi, M. J., McDonagh, A. M., Maynard, P., & Roux, C. (2008). Metal-containing nanoparticles and nano-structured particles in fingerprint detection. *Forensic Science International*, 179(2), 87–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.04.027>
- Collins, F. W. (1989). Oat phenolics: avenanthramides, novel substituted N-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(1), 60–66. <https://doi.org/10.1021/jf00085a015>
- Damge, C., Maincent, P., & Ubrich, N. (2007). Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 117(2), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.10.023>
- de Bruijn, W. J. C., van Dinteren, S., Gruppen, H., & Vincken, J.-P. (2019). Mass spectrometric characterisation of avenanthramides and enhancing their production by germination of oat (*Avena sativa*). *Food Chemistry*, 277, 682–690. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.013>
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Dempsey, C. E. (1990). The actions of melittin on membranes. *BBA - Reviews on Biomembranes*, 1031(2), 143–161. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(90\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0304-4157(90)90006-X)
- des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.-J., & Preat, V. (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 116(1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.08.013>
- Dominguez, G. A., Lohse, S. E., Torelli, M. D., Murphy, C. J., Hamers, R. J., Orr, G., & Klaper, R. D. (2015). Effects of charge and surface ligand properties of nanoparticles on oxidative stress and gene expression within the gut of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 162, 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.015>
- Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., ... Nedović, V. (2015). Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food*

- Duan, X., & Li, Y. (2013). Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. *Small*, 9(9–10), 1521–1532. <https://doi.org/10.1002/sml.201201390>
- Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., Santos, N. C., & Franco, O. L. (2017). Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Frontiers in Chemistry*, 5, 5. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00005>
- Garvin, S., Ollinger, K., & Dabrosin, C. (2006). Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Letters*, 231(1), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.01.031>
- Ginter, E. (2008). Vegetarian diets, chronic diseases and longevity. *Bratislavske Lekarske Listy*, 109(10), 463–466.
- Ginter, E., & Simko, V. (2015). *Recent data on Mediterranean diet , cardiovascular disease , cancer , diabetes and life expectancy*. 116(6), 346–348. <https://doi.org/10.4149/BLL>
- Golubnitschaja, O. (2007). *Cell cycle checkpoints : the role and evaluation for early diagnosis of senescence , cardiovascular , cancer , and neurodegenerative diseases Review Article*. 359–371. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0473-0>
- Gomez-Gaete, C., Tsapis, N., Besnard, M., Bochot, A., & Fattal, E. (2007). Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 331(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.028>
- Guo, W., Nie, L., Wu, D., Wise, M. L., Collins, F. W., Meydani, S. N., & Meydani, M. (2010). Avenanthramides inhibit proliferation of human colon cancer cell lines in vitro. *Nutrition and Cancer*, 62(8), 1007–1016. <https://doi.org/10.1080/01635581.2010.492090>
- Hait, W. N., Grais, L., Benz, C., & Cadman, E. C. (1985). *ancer hemotherapy and harmacology Inhibition of growth of leukemic cells by inhibitors of calmodulin : Phenothiazines and melittin I00 Mellitin*. 202–205.
- HAIT, W. N., & LEE, and G. L. (1988). Honeybee venom: A rich source of pharmacologically active peptides. *Endeavour*, 12(2), 60–65. [https://doi.org/10.1016/0160-9327\(88\)90082-8](https://doi.org/10.1016/0160-9327(88)90082-8)
- HAVAS, L. J. (1950). Effect of Bee Venom on Colchicine-induced Tumours. *Nature*, 166(4222), 567–568. <https://doi.org/10.1038/166567a0>
- Holle, L., Song, W., Holle, E., Wei, Y., Wagner, T., & Yu, X. (2015). *A matrix metalloproteinase 2 cleavable melittin / avidin conjugate specifically targets tumor cells in vitro and in vivo . A matrix*

metalloproteinase 2 cleavable melittin / avidin conjugate specifically targets tumor cells in vitro and in vivo. (June). <https://doi.org/10.3892/ijo.22.1.93>

- Hu, H., Chen, D., Li, Y., & Zhang, X. (2006). Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/c nude mice in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(1), 83–89. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.1.0010>
- Huang, D., Liao, F., Moles, S., Redinger, D., & Subramanian, V. (2003). Plastic-Compatible Low Resistance Printable Gold Nanoparticle Conductors for Flexible Electronics. *Journal of The Electrochemical Society*, 150(7), G412–G417. <https://doi.org/10.1149/1.1582466>
- Huang, R., & Lau, B. L. T. (2016). Biomolecule–nanoparticle interactions: Elucidation of the thermodynamics by isothermal titration calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(5), 945–956. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.01.027>
- Hui, L., Leung, K., & Chen, H. M. (2002). The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells. *Anticancer Research*, 22(5), 2811—2816. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/12530001>
- Jahanshahi, M., & Babaei, Z. (2008). Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 7. <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i25.59701>
- Jo, D. H., Kim, J. H., Lee, T. G., & Kim, J. H. (2015). Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(7), 1603–1611. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.04.015>
- Jørgensen, K., Davidsen, J., Andresen, T. L., & Mouritsen, O. G. (2004, February 17). Rational Design of a Liposomal Drug Delivery System Based on Biophysical Studies of Phospholipase A2 Activity on Model Lipid Membranes. *Lipases and Phospholipases in Drug Development*, pp. 41–54. <https://doi.org/doi:10.1002/3527601910.ch3>
- Kahraman, E., Güngör, S., & Ozsoy, Y. (2017). Potential enhancement and targeting strategies of polymeric and lipid-based nanocarriers in dermal drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 8, 967–985. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0075>
- Kang, C., Shin, W. S., Yeo, D., Lim, W., Zhang, T., & Ji, L. L. (2018). Anti-inflammatory effect of avenanthramides via NF-κB pathways in C2C12 skeletal muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 117, 30–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.020>
- Kapinova, A., Kubatka, P., Golubnitschaja, O., Kello, M., Zubor, P., Solar, P., & Pec, M. (2018). Dietary phytochemicals in breast cancer research: anticancer effects and potential utility for effective chemoprevention. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 23(1), 36.

<https://doi.org/10.1186/s12199-018-0724-1>

- Katz, D. L., Nawaz, H., Boukhalil, J., Chan, W., Ahmadi, R., Giannamore, V., & Sarrel, P. M. (2001). Effects of oat and wheat cereals on endothelial responses. *Preventive Medicine*, 33(5), 476–484. <https://doi.org/10.1006/pmed.2001.0918>
- Killion, J. J., & Dunn, J. D. (1986). Differential cytolysis of murine spleen, bone-marrow and leukemia cells by melittin reveals differences in membrane topography. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 139(1), 222–227. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(86\)80102-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(86)80102-4)
- Kizilkaya, B., Cevik, N., & Turker, G. (2013). The Phenolic Compounds in Berries: Beneficial Effects on Human Health. *New Knowledge Journal of Science*, 52–55. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9041-7>
- Knöppel, E., Eisenberg, D., & Wickner, W. (1979). Interactions of Melittin, a Preprotein Model, with Detergents. *Biochemistry*, 18(19), 4177–4181. <https://doi.org/10.1021/bi00586a021>
- Koenig, R. T., Dickman, J. R., Wise, M. L., & Ji, L. L. (2011). Avenanthramides are bioavailable and accumulate in hepatic, cardiac, and skeletal muscle tissue following oral gavage in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6438–6443. <https://doi.org/10.1021/jf2002427>
- Koenig, R. T., & Parkin, K. (2012). AVENANTHRAMIDE SUPPLEMENTATION IN YOUNG AND OLDER WOMEN: PROTECTION AGAINST ECCENTRIC EXERCISE-INDUCED INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS.
- Kostarelos, K. (2010, April). Nanorobots for medicine: how close are we? *Nanomedicine (London, England)*, Vol. 5, pp. 341–342. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.19>
- Kreuter, J. (2015). Influence of chronobiology on the nanoparticle-mediated drug uptake into the brain. *Pharmaceutics*, 7(1), 3–9. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7010003>
- Langer, K., Coester, C., Weber, C., von Briesen, H., & Kreuter, J. (2000). Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 49(3), 303–307.
- Lazo, J. S., Hait, W. N., Kennedy, K. A., Braun, I. D., & Meandzija, B. (1985). Enhanced bleomycin-induced DNA damage and cytotoxicity with calmodulin antagonists. *Molecular Pharmacology*, 27(3), 387 LP-393. Retrieved from <http://molpharm.aspetjournals.org/content/27/3/387.abstract>
- Lee, K. S., Chung, H. C., Im, S. A., Park, Y. H., Kim, C. S., Kim, S.-B., ... Ro, J. (2008). Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in

- patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 108(2), 241–250.
<https://doi.org/10.1007/s10549-007-9591-y>
- Lee, Y. J., Kang, S. J., Kim, B. M., & Kim, Y. J. (2007). *Cytotoxicity of honeybee (Apis mellifera) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells*. 169, 189–197.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.06.036>
- Li, J., Zhao, L., Huang, X., Liu, L., Zhang, Z., Chen, Y., ... Gong, L. (2016). Polyethyleneglycol-modified poly(d,l-lactide-co-glycolide) loaded resveratrol nanoparticles characterization and their anti-cancer activities. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(9), 9477–9481.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12368>
- Liao, C., Esai Selvan, M., Zhao, J., Slimovitch, J. L., Schneebeli, S. T., Shelley, M., ... Li, J. (2015). Melittin Aggregation in Aqueous Solutions: Insight from Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(33), 10390–10398. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03254>
- Liu, L., Zubik, L., Collins, F. W., Marko, M., & Meydani, M. (2004). The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds. *Atherosclerosis*, 175(1), 39–49.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.01.044>
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12 Suppl), 3479S–3485S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479S>
- Liu, T. M., Musinski, L. D., Patel, P. R., Gallimore, A. D., Gilchrist, B. E., & Keidar, M. (2007). Nanoparticle Electric Propulsion for Space Exploration. *AIP Conference Proceedings*, 880(1), 787–794. <https://doi.org/10.1063/1.2437518>
- Lizárraga-velázquez, C. E., Hernández, C., & González-aguilar, G. A. (2018). *Propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes de polifenoles en peces carnívoros de cultivo Antioxidant and immunostimulant properties of polyphenols in carnivorous farmed fish*. (March).
<https://doi.org/10.29059/cienciauat.v12i2.904>
- Lovisolio, D., Dionisi, M., A. Ruffinatti, F., & Distasi, C. (2018). Nanoparticles and potential neurotoxicity: focus on molecular mechanisms. *AIMS Molecular Science*, 5(1), 1–13.
<https://doi.org/10.3934/molsci.2018.1.1>
- Ma, H., Lai, F., Xie, H., Wang, J., & Wang, H. (2008). Involvement of the Bcl-2 family members in Pinus massoniana bark extract induced apoptosis in HeLa cells. *Phytotherapy Research : PTR*, 22(11), 1472–1476. <https://doi.org/10.1002/ptr.2496>
- Marmouzi, I., & Ezzat, S. M. (2018). Chapter 1 - The Pharmacology of Avenanthramides: Polyphenols. In R. R. Watson, V. R. Preedy, & S. Zibadi (Eds.), *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease (Second Edition)* (Second Edi, pp. 3–13). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12->

- Mccarthy, D., Malhotra, M., O'Mahony, A., Cryan, J., & O'Driscoll, C. (2014). Nanoparticles and the Blood-Brain Barrier: Advancing from In-Vitro Models Towards Therapeutic Significance. *Pharmaceutical Research*, 32. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1545-6>
- Meng, Q., Yuan, F., Goldberg, I. D., Rosen, E. M., Auburn, K., & Fan, S. (2000). Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen receptor-alpha signaling in human tumor cells. *The Journal of Nutrition*, 130(12), 2927–2931. <https://doi.org/10.1093/jn/130.12.2927>
- Meydani, M. (2009). Potential health benefits of avenanthramides of oats. *Nutrition Reviews*, 67(12), 731–735. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00256.x>
- Miura, Y. (2015). *NMR chemical shift analysis of the conformational transition between the monomer and tetramer of melittin in an aqueous solution*. <https://doi.org/10.1007/s00249-015-1102-1>
- Moon, D.-O., Park, S.-Y., Heo, M.-S., Kim, K.-C., Park, C., Ko, W. S., ... Kim, G.-Y. (2006). Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *International Immunopharmacology*, 6(12), 1796–1807. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.07.027>
- Mu, L., & Feng, S. S. (2003). A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 86(1), 33–48. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00320-6](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00320-6)
- MUFSON, R. A., LASKIN, J. D., FISHER, P. B., & WEINSTEIN, I. B. (1979). Melittin shares certain cellular effects with phorbol ester tumour promoters. *Nature*, 280(5717), 72–74. <https://doi.org/10.1038/280072a0>
- Multari, S., Pihlava, J.-M., Ollennu-Chuasam, P., Hietaniemi, V., Yang, B., & Suomela, J.-P. (2018). Identification and Quantification of Avenanthramides and Free and Bound Phenolic Acids in Eight Cultivars of Husked Oat (*Avena sativa* L) from Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(11), 2900–2908. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05726>
- Nagpal, K., Singh, S., & Mishra, D. (2010). Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 58, 1423–1430. <https://doi.org/10.1248/cpb.58.1423>
- Nazareno, E. S., Li, F., Smith, M., Park, R. F., Kianian, S. F., & Figueroa, M. (2018). Puccinia coronata f. sp. avenae: a threat to global oat production. *Molecular Plant Pathology*, 19(5), 1047–1060. <https://doi.org/10.1111/mpp.12608>
- Nie, L., Wise, M. L., Peterson, D. M., & Meydani, M. (2006). Avenanthramide, a polyphenol from oats,

- inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and enhances nitric oxide production. *Atherosclerosis*, 186(2), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.07.027>
- Oldfield ML. (1998). The value of conserving genetic resources. *Sinauer Associates, Inc.*, 1, 379.
- Oren, Z., & Shai, Y. (1997). Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: Structure-function study. *Biochemistry*, 36(7), 1826–1835. <https://doi.org/10.1021/bi9625071>
- Oršolić, N. (2012). Bee venom in cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(1–2), 173–194. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9339-3>
- Ota, N., Takano, F., Muroga, S., Kawabata, T., Ishigaki, Y., Yahagi, N., & Ohta, T. (2012). Garlic extract and its selected organosulphur constituents promote ileal immune responses ex vivo. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 243–252. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.11.003>
- Othman, S. H. (2014). Bio-nanocomposite Materials for Food Packaging Applications: Types of Biopolymer and Nano-sized Filler. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 296–303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.042>
- Pak, S. C. (2016). An Introduction to the Toxins Special Issue on “Bee and Wasp Venoms: Biological Characteristics and Therapeutic Application.” *Toxins*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/toxins8110315>
- Pan, H., Soman, N. R., Schlesinger, P. H., Lanza, G. M., & Wickline, S. A. (2011). *Cytolytic peptide nanoparticles (‘ NanoBees ’) for cancer therapy*. <https://doi.org/10.1002/wnan.126>
- Panyam, J., & Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(3), 329–347.
- Pedras, M. S., Jha, M., & Ahiahonu, P. (2003). The Synthesis and Biosynthesis of Phytoalexins Produced by Cruciferous Plants. *Current Organic Chemistry*, 7, 1635–1647. <https://doi.org/10.2174/1385272033486242>
- Perelshtein, I., Applerot, G., Perkash, N., Guibert, G., Mikhailov, S., & Gedanken, A. (2008). Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity. *Nanotechnology*, 19(24), 245705. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/24/245705>
- Perrelli, A., Goitre, L., Salzano, A. M., Moglia, A., Scaloni, A., & Retta, S. F. (2018). *Review Article Biological Activities , Health Benefits , and Therapeutic Properties of Avenanthramides : From Skin Protection to Prevention and Treatment of Cerebrovascular Diseases. 2018(Ldl)*.
- Peterson, D. M., Hahn, M. J., & Emmons, C. L. (2002). Oat avenanthramides exhibit antioxidant activities in vitro. *Food Chemistry*, 79(4), 473–478. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308->

- Pino-Angeles, A., & Lazaridis, T. (2018). Effects of Peptide Charge, Orientation, and Concentration on Melittin Transmembrane Pores. *Biophysical Journal*, 114(12), 2865–2874.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.05.006>
- Pridal, A. A., Böttger, W., & Ross, A. B. (2018). Analysis of avenanthramides in oat products and estimation of avenanthramide intake in humans. *Food Chemistry*, 253, 93–100.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.138>
- Rady, I., Siddiqui, I. A., Rady, M., & Mukhtar, H. (2017). Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters*, 402, 16–31.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.010>
- Raghuvanshi, R. S., Katare, Y. K., Lalwani, K., Ali, M. M., Singh, O., & Panda, A. K. (2002). Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *International Journal of Pharmaceutics*, 245(1–2), 109–121. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00342-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00342-3)
- Rasane, P., Jha, A., & Sabikhi, L. (2013). *Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review*. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1072-1>
- Rasane, P., Jha, A., Sabikhi, L., Kumar, A., & Unnikrishnan, V. S. (2015). Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 662–675. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1072-1>
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>
- Sahana, D. K., Mittal, G., Bhardwaj, V., & Kumar, M. N. V. R. (2008). PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(4), 1530–1542. <https://doi.org/10.1002/jps.21158>
- Salamanca-Buentello, F., Persad, D. L., Court, E. B., Martin, D. K., Daar, A. S., & Singer, P. A. (2005). Nanotechnology and the developing world. *PLoS Medicine*, 2(5), e97–e97.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020097>
- Saltzman, E., Das, S. K., Lichtenstein, A. H., Dallal, G. E., Corrales, A., Schaefer, E. J., ... Roberts, S. B. (2001). An oat-containing hypocaloric diet reduces systolic blood pressure and improves lipid profile beyond effects of weight loss in men and women. *The Journal of Nutrition*, 131(5), 1465–1470. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1465>

- Salvatore, E., Elena, S., Francesco, A., & Michele, P. (2017). Antiproliferative activity of vitexin-2- O - xyloside and avenanthramides on CaCo-2 and HepG2 cancer cells occurs through apoptosis induction and reduction of pro-survival mechanisms. *European Journal of Nutrition*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1418-y>
- Schroeder, U., Sommerfeld, P., Ulrich, S., & Sabel, B. A. (1998). Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(11), 1305–1307. <https://doi.org/10.1021/js980084y>
- Shenoy, D. B., & Amiji, M. M. (2005). Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 293(1–2), 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.12.010>
- Shinde, N. C., Keskar, N. J., & Argade, P. D. (2012). Nanoparticles: Advances in drug delivery systems. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3, 922–929.
- Singh, S. V., & Singh, K. (2012). Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. *Carcinogenesis*, 33(10), 1833–1842. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs216>
- Soman, N. R., Baldwin, S. L., Hu, G., Marsh, J. N., Lanza, G. M., Heuser, J. E., ... Schlesinger, P. H. (2009). Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2830–2842. <https://doi.org/10.1172/JCI38842>
- Soman, N. R., Lanza, G. M., Heuser, J. M., Schlesinger, P. H., & Wickline, S. A. (2008). Synthesis and characterization of stable fluorocarbon nanostructures as drug delivery vehicles for cytolytic peptides. *Nano Letters*, 8(4), 1131–1136. <https://doi.org/10.1021/nl073290r>
- Son, D. J., Lee, J. W., Lee, Y. H., Song, H. S., Lee, C. K., & Hong, J. T. (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology and Therapeutics*, 115(2), 246–270. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.004>
- Srivastava, R. M., Srivastava, S., Singh, M., Bajpai, V. K., & Ghosh, J. K. (2012). Consequences of alteration in leucine zipper sequence of melittin in its neutralization of lipopolysaccharide-induced proinflammatory response in macrophage cells and interaction with lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1980–1995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302893>
- Stankowski, S., Pawlak, M., Kaisheva, E., Robert, C. H., & Schwarz, G. (1991). A combined study of aggregation, membrane affinity and pore activity of natural and modified melittin. *BBA - Biomembranes*, 1069(1), 77–86. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90106-I](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90106-I)
- Stark, W. J., Stoessel, P. R., Wohlleben, W., & Hafner, A. (2015). Industrial applications of nanoparticles.

- Chemical Society Reviews*, 44(16), 5793–5805. <https://doi.org/10.1039/c4cs00362d>
- Sur, R., Nigam, A., Grote, D., Liebel, F., & Southall, M. D. (2008). Avenanthramides, polyphenols from oats, exhibit anti-inflammatory and anti-itch activity. *Archives of Dermatological Research*, 300(10), 569–574. <https://doi.org/10.1007/s00403-008-0858-x>
- Takaichi, S. (2011). Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9(6), 1101–1118. <https://doi.org/10.3390/md9061101>
- Tanaka, T., Shnimizu, M., & Moriwaki, H. (2012). Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(3), 3202–3242. <https://doi.org/10.3390/molecules17033202>
- Terwilliger, T. C., Weissman, L., & Eisenberg, D. (1982). The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities. *Biophysical Journal*, 37(1), 353–361. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(82\)84683-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(82)84683-3)
- Tiyaboonchai, W. (2003). Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal*, 11, 51–66.
- Tripathi, V., Mohd, A. S., & Ashraf, T. (2018). Avenanthramides of Oats: Medicinal Importance and Future Perspectives. *Pharmacognosy Reviews*, 12(23).
- Utkin, Y. N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(2), 28. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i2.28>
- van Vlerken, L. E., Vyas, T. K., & Amiji, M. M. (2007). Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharmaceutical Research*, 24(8), 1405–1414. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9284-6>
- Varenne, F., Makky, A., Gaucher-Delmas, M., Violleau, F., & Vauthier, C. (2016). Multimodal Dispersion of Nanoparticles: A Comprehensive Evaluation of Size Distribution with 9 Size Measurement Methods. *Pharmaceutical Research*, 33(5), 1220–1234. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1867-7>
- Ventola, C. L. (2017). Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 42(12), 742–755.
- Walsh, E. G., Maher, S., Devocelle, M., O'Brien, P. J., Baird, A. W., & Brayden, D. J. (2011). High content analysis to determine cytotoxicity of the antimicrobial peptide, melittin and selected structural analogs. *Peptides*, 32(8), 1764–1773. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.06.006>
- Walters, M., Ribeiro, A. P. L., Hosseinian, F., & Tsopmo, A. (2018). Phenolic acids, avenanthramides, and antioxidant activity of oats defatted with hexane or supercritical fluid. *Journal of Cereal Science*, 79, 21–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.09.010>

- Wang, C., & Eskiw, C. H. (2019). Cytoprotective effects of Avenanthramide C against oxidative and inflammatory stress in normal human dermal fibroblasts. *Scientific Reports*, 9(1), 2932. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39244-9>
- Wang, P., Chen, H., Zhu, Y., McBride, J., Fu, J., & Sang, S. (2015). Oat Avenanthramide-C (2c) Is Biotransformed by Mice and the Human Microbiota into Bioactive Metabolites. *The Journal of Nutrition*, 145, 239–245. <https://doi.org/10.3945/jn.114.206508>
- Wen-Ru Li, Xiao-Bao Xie, Qing-Shan Shi, Shun-Shan Duan, You-Sheng Ouyang Chen, Y.-B. (2015). Antibacterial effect of silver nanoparticles on talc composites. *Research on Chemical Intermediates*, 41(1), 251–263. <https://doi.org/10.1007/s11164-013-1188-y>
- Wu, Q., Patocka, J., & Kuca, K. (2018). Insect Antimicrobial Peptides, a Mini Review. *Toxins*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/toxins10110461>
- Xu, Q., Ensign, L. M., Boylan, N. J., Schön, A., Gong, X., Yang, J.-C., ... Hanes, J. (2015). Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus ex Vivo and Distribution in Vivo. *ACS Nano*, 9(9), 9217–9227. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03876>
- Yadav, N., Khatak, S., & Sara, U. V. (2013). Solid lipid nanoparticles- A review. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 5, 8–18.
- Yamakawa, M. (1998). Insect antibacterial proteins : Regulatory mechanisms of their synthesis and a possibility as new antibiotics . Laboratory of Biological Defense , Department of Insect Physiology and Behavior , National Institute of Sericultural and Ento. *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 67, 163–168.
- Yang, K., & Ma, Y. Q. (2010). Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nature Nanotechnology*, 5(8), 579–583. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.141>
- Yang, R.-S., Tang, C.-H., Chuang, W.-J., Huang, T.-H., Peng, H.-C., Huang, T.-F., & Fu, W.-M. (2005). Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. *Toxicon*, 45(5), 661–669. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.01.013>
- Yu, Z., Yu, M., Zhang, Z., Hong, G., & Xiong, Q. (2014). Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 343. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-343>
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., & Vigneron, C. (1999). Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 60(2–3), 179–188. <https://doi.org/10.1016/s0168->

- Zhang, S., Liu, Y., Ye, Y., Wang, X.-R., Lin, L.-T., Xiao, L.-Y., ... Liu, C.-Z. (2018). Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. *Toxicon*, 148, 64–73.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.012>
- Zhang, W., Chen, H., Liu, D.-L., Li, H., Luo, J., Zhang, J.-H., ... Lin, S.-Z. (2013). Emodin sensitizes the gemcitabine-resistant cell line Bxpc-3/Gem to gemcitabine via downregulation of NF-kappaB and its regulated targets. *International Journal of Oncology*, 42(4), 1189–1196.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1839>
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D., Li, S., Chen, Y., & Li, H. (2016). *Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer*. <https://doi.org/10.3390/nu8080515>
- Zhu, H. G., Tayeh, I., Israel, L., & Castagna, M. (1991). Different susceptibility of lung cell lines to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 5(2), 52—58. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/1910248>

RESUMEN BIOGRÁFICO

Arely Matamoros Acosta

Candidata para el Grado de

Doctorado en Ciencias con Orientación en Biotecnología

**Tesis: DESARROLLO DE NANOSISTEMAS POLIMÉRICOS INCORPORANDO
ACTIVOS NATURALES Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN
VITRO*.**

Campo de Estudio: Biotecnología

Datos Personales: Nacida en Hidalgo del Parral Chihuahua el 15 de octubre de 1991, hija de Oscar Matamoros Quiñonez y Verónica Acosta Balderrama.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciada en Biotecnología Genómica en 2015.

Experiencia Profesional: Maestra por horas en la Facultad de Ciencias Biológicas, Tutora de proyectos de ciencia y tecnología en nivel básico T-rex education.

Anexos